

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Caractérisation d'ARNs circulaires encodés par un herpesvirus oncogénique

Trozzi, Gabrielle

Award date:
2021

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**CARACTERISATION D'ARNs CIRCULAIRES ENCODES PAR UN HERPESVIRUS
ONCOGENIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Gabrielle Trozzi

Août 2020

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Caractérisation d'ARNs circulaires encodés par un herpesvirus oncogénique

TROZZI Gabrielle

Résumé

Le Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2), également connu sous le nom de Marek's Disease Virus, est un alphaherpesvirus du poulet. Ce virus est utilisé pour explorer les lymphomes viro-induit dans un modèle d'infection naturel. Dans le cadre de ce mémoire, il a été utilisé pour explorer et caractériser l'existence d'une nouvelle classe d'ARNs non codants, les ARN circulaires (circRNAs). Des circRNAs viraux ont été découverts récemment dans différentes infections virales tels que les papillomavirus humains oncogènes et les herpesvirus humains.

Cette étude vise à découvrir des circRNAs codés par une unité transcriptionnelle oncogénique de GaHV-2 associée à l'expression de l'oncogène viral majeur, la protéine Meq. Cette protéine fait partie de la famille des protéines leucine-zipper et a un rôle de facteur de transcription. Des circRNAs associés à *meq* ont été découverts et analysés. Le profil d'expression de ces circRNAs viraux a été analysé à partir de différentes lignées cellulaires pour déterminer à quels stades de l'infection virale (réplication, latence ou réactivation) les circRNAs sont exprimés.

Contrairement aux autres circRNAs de GaHV-2 qui sont exprimés principalement pendant les phases lytique et de réactivation, les résultats ont montré que certains circRNAs, associés au gène *meq*, sont continuellement exprimés lors du cycle viral. L'abondance de ces circRNAs a été étudiée et un circRNA est plus exprimé que les autres, le major Meq circRNA. Les fonctions de ce circRNA ont été explorées par prédiction bio-informatique et par génération d'un outil de surexpression de circRNAs.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2020

Promoteur: Damien Coupeau

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Madame Patsy Renard, Monsieur Yves Poumay, Madame Isabelle Gennart et Monsieur Marino Caruso, de prendre de leur temps afin de lire mon mémoire.

Je remercie Benoit pour tout ce qu'il a fait pour moi. Benoit, tu m'as tendu la main au moment où j'en avais le plus besoin et pour ça je te serai éternellement reconnaissante. Tu as toujours cru en moi, tu m'as toujours soutenue et tu as su voir en moi ce que moi-même je ne voyais pas. Tu es une personne incroyable avec un cœur énorme qui se préoccupe plus du bien-être des autres que du sien. Tu as un milliard de choses à faire mais tu prends toujours le temps de t'assurer que ton équipe va bien. C'est pour toutes ces choses que je t'admire.

Damien, il y a tellement de choses à dire sur toi que je pourrais en faire un livre. Tout n'a pas toujours été facile entre nous et les débuts furent compliqués mais tu n'as pas abandonné et tu m'as laissé le temps de m'adapter et de reprendre confiance. Aujourd'hui, je me rends compte de la chance que j'ai eu et je ne pourrai jamais assez te remercier. J'admire ta capacité à pouvoir suivre les projets de tout le monde et à trouver des solutions à tous les problèmes. J'admire également ta pédagogie et ton calme, me supporter n'a d'ailleurs pas dû être de tout repos. Tout ce que j'ai appris durant ce mémoire, c'est grâce à toi et à toi seul. J'espère que tu garderas un bon souvenir de moi et je peux enfin le dire, tu n'auras pas réussi à me faire craquer !

Je remercie tous les membres de l'URVI, je suis fière d'avoir fait partie de cette grande famille. Ma Laeti, maman canard pour les intimes, tu es une femme incroyable et j'ai de la chance d'avoir toujours pu compter sur toi. Tu as toujours été là pour moi et je t'en remercie, tu es l'une de mes plus belles rencontres à l'URVI. Astrid pour ta gentillesse exceptionnelle, Chantal pour ton sourire tous les matins, Hélène parce que j'ai trouvé quelqu'un qui me comprend et qui m'encourage continuellement, Florian pour les conseils et les conversations à propos de tout et n'importe quoi, Noémie principalement pour avoir pris le temps de m'expliquer le northern blot alors que tu n'en a jamais fait et Kevin pour être toujours de bonne humeur et chanter continuellement des chansons complètement inconnues pour moi. Srđan, I thank you to never said to me that my English is horrible and to do your best to understand me. Nico, que dire, tu m'as supporté, tu m'as écouté parler pendant des heures. J'ai appris à connaître le petit assistant de physio an et je suis fière de dire que c'est devenu un ami pour moi. Merci d'être cette personne incroyable. Laura, mi amor, merci d'avoir été comme une sœur pour moi. Tu es exceptionnelle, tu arrives toujours à faire rire tout le monde et tu m'as permis d'améliorer mon anglais. J'espère avoir été un bon professeur de français pour toi. Crois en toi, tu es la meilleure et tu auras ton doctorat haut la main. Tu vas me manquer !

Je remercie mes copains de labo, Alexandra, Alexis et Olivier. On a formé une équipe de choc et grâce à vous, ce mémoire fut mille fois meilleur. Alexandra, tu as réussi à ramener le côté fille qui manquait à notre équipe et ta naïveté fait tout ton charme. Je suis sincèrement heureuse d'avoir pu te connaître, tu resteras une très belle rencontre. Alexis, tu es la personne la plus fatigante que je connaisse, je te l'ai assez répété mais parler avec toi tous les midis de tes connaissances insolites me manquent déjà. Reste la personne honnête et juste que tu es et tout ira bien pour toi. Olivier, la vie nous a obligé à nous connaître et surtout t'a forcé à me supporter. Six ans qu'on se connaît et il aura quand même fallu trois ans pour qu'on devienne ami mais aujourd'hui je suis heureuse d'avoir eu une personne comme toi à mes côtés. Les trajets en train vont me manquer terriblement ainsi que tout le reste. Je remercie également tous les stagiaires qui sont arrivés et partis durant mon mémoire. Vous m'avez fait sourire, rire, énerver, pousser à bout parfois mais vous m'avez surtout appris à devenir quelqu'un de meilleur.

Merci aux personnes que j'ai rencontrées durant ce master, l'intégration fut compliquée au début mais aujourd'hui je suis heureuse d'avoir choisi ces études et d'être tombée avec vous.

Je remercie, pour finir, ma famille pour tout et bien plus encore. Vous avez toujours été derrière moi, même si ça n'a pas toujours été facile. Vous avez supporté mes pleurs, mes rires et mes crises de nerfs. Vous êtes toujours à l'écoute de mes histoires scientifiques alors que vous comprenez à moitié rien. Merci maman pour tous les sacrifices tous les jours pour qu'on soit heureux. Merci Gaëlle et Jaja pour me permettre de me déconnecter de mon monde et de me reconnecter à la réalité et aussi pour me rappeler qu'on restera toujours unis. Pour terminer, merci Xavier de m'avoir supporté et soutenu durant ces années. J'espère que tu continueras à me suivre dans mes idées toutes plus farfelues les unes que les autres.

Merci à tous, pour tout.

Abréviations :

5'Aza : 5 azacitidine

ADAR1 : adenosine deaminase acting on RNA

bZIP : basic leucine zipper

CEF : Chicken Embryonic Fibroblasts

circRNA : ARN circulaire

CS : Chicken Serum

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium

EBV : Epstein-Barr Virus

EciRNAs : Exonic circRNAs

EIciRNAs : Exons and Introns circRNAs

ESCDL-1 : Embryonic Stem Cell Derived Line 1

FBS : Fetal Bovine Serum

GaHV-2 : Gallid Herpesvirus 2

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

HHV : Herpes simplex virus

HPV : Human PapillomaVirus

IciRNAs : Intronic circRNAs

ICS : Intronic Complementary Sequence

IRES : Internal Ribosome Entry Site

IRL : Internal Repeat Long

IRS : Internal Repeat Short

KSHV : Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus

LATs : latency associated transcript

MBL : musclebind

MDV : Marek's Disease Virus

Meq : Marek's EcoRI-Q-encoded protein

MERE : Meq Response Element

miRNAs : Micro RNAs

NaBu : butyrate de sodium

NEAA : Non-Essential Amino Acids

NEB : New-England Biolabs

NMD : nonsense-mediated decay
ORF : Open Reading Frame
PCR : Polymerase Chain Reaction
PS : Penicillin Streptomycin
QKI : Quaking
RBP : RNA binding protein
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT : Room Temperature
SF1 : Splicing Factor 1
snRNA : small nuclear RNA
snRPNs : small nuclear ribonucleoprotein
TAE : tris-acétate-EDTA
TRL : Terminal Repeat Long
TRS : Terminal Repeat Short
U2AF : U2 Auxiliary Factor
UL : Unique Long
US : Unique Short
vIL-8 : viral Interleukin 8

Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Les ARNs circulaires :	1
1.2. Expression et localisation des circRNAs :	3
1.3. Biogénèse :	5
1.3.1. L'épissage (splicing) :	5
1.3.1.1. Séquences consensus :	5
1.3.1.2. Le spliceosome :	7
1.3.1.3. L'épissage alternatif :	9
1.3.1.4. Le backsplicing :	9
1.4. Régulation des circRNAs :	11
1.5. Fonctions des circRNAs :	13
1.5.1. Eponges à miRNAs :	13
1.5.2. Régulateur de gènes :	13
1.5.3. Interactions avec les protéines :	15
1.5.4. CircRNAs traduits :	15
1.6. Les circRNAs chez les virus :	19
1.7. Le virus de la maladie de Marek :	21
1.7.1. Cycle infectieux du virus :	21
1.7.2. Génome du virus :	21
1.7.2.1. Meq	23
1.7.2.2. vIL-8	23
1.7.2.3. MiRNAs	23
1.7.2.4. LATs	25
2. Objectifs	27
3. Matériels et méthodes	29
3.1. Lignées cellulaires :	29
3.1.1. DF1	29
3.1.2. MSB1	29
3.1.3. ESCDL1	29
3.2. Vecteurs :	29
3.3. Extraction d'ARN :	29
3.4. Traitement DNase :	31
3.5. Traitement phénol/chloroforme :	31

3.6.	Traitement RNase :	31
3.7.	Rétrotranscription :	31
3.8.	PCR :	31
3.9.	Electrophorèse :	33
3.10.	Purification de produits de PCR :	33
3.11.	Digestion de vecteurs et d'inserts :	33
3.12.	Ligation :	33
3.13.	Electroporation :	33
3.14.	Screen bactérien :	35
3.15.	Préparation de l'ADN plasmidique :	35
3.16.	Transfection :	35
3.17.	Northern blot :	37
3.17.1.	Préparation des sondes.....	37
3.17.2.	Migration	37
3.17.3.	Transfert passif	37
3.17.4.	Fixation.....	37
3.17.5.	Hybridation.....	37
3.17.6.	Détection.....	37
4.	Résultats	41
4.1.	Mise au point d'un protocole d'identification des circRNAs.....	41
4.2.	Identification de circRNAs produits par le gène <i>meq</i>	43
4.3.	Expression du major Meq circRNA durant le cycle viral	45
4.4.	Génération d'un système artificiel induisant la production de circRNAs	47
4.4.1.	Production artificielle du major Meq circRNA.....	47
4.4.2.	Vérification du système artificiel	51
4.5.	Etude de l'abondance des différents transcrits issus du gène <i>meq</i>	53
4.6.	Prédiction bio-informatique.....	57
5.	Discussion et perspectives.....	59
6.	Conclusion.....	67
	Bibliographie	69

1. Introduction

1.1. Les ARNs circulaires :

Les ARNs circulaires (circRNAs) sont une nouvelle classe d'ARNs simples brins, majoritairement non codants. Les circRNAs ont été longtemps considérés comme des produits aberrants de l'épissage ou des artéfacts d'expérience, il aura fallu attendre le début des années 90 pour qu'ils soient reconnus comme de vrais produits de l'épissage (Awasthi et al. 2018). Leur rareté et la difficulté d'aborder leur fonction ont fait qu'ils ont été au départ très peu étudié (Enuka et al. 2016).

Les circRNAs existent sous différentes formes chez de nombreux organismes allant des vers à l'homme (Bose et Ain 2018). Ces dernières années de nombreux circRNAs ont été identifiés chez les eucaryotes tels que les mammifères, les champignons, les plantes,... et les virus (Kristensen et al. 2019).

Ces circRNAs sont issus de la circularisation d'un ou plusieurs exons et/ou introns lors de l'épissage médié par le spliceosome. Cette circularisation est issue d'une liaison covalente entre une extrémité 3' donneuse en aval et une extrémité 5' accepteuse en amont (Figure 1). Les circRNAs sont plus stables que les autres ARNs linéaires. Cette stabilité provient de l'absence d'extrémités libres conférant une résistance aux exonucléases (Awasthi et al. 2018). Ils ont un temps de demi vie deux fois et demi supérieur à celui des ARN linéaires (López-Jiménez, Rojas, et Andrés-León 2018). Les circRNAs les plus simples font une quarantaine de nucléotides et certains font plusieurs centaines de kilobases (Bose et Ain 2018).

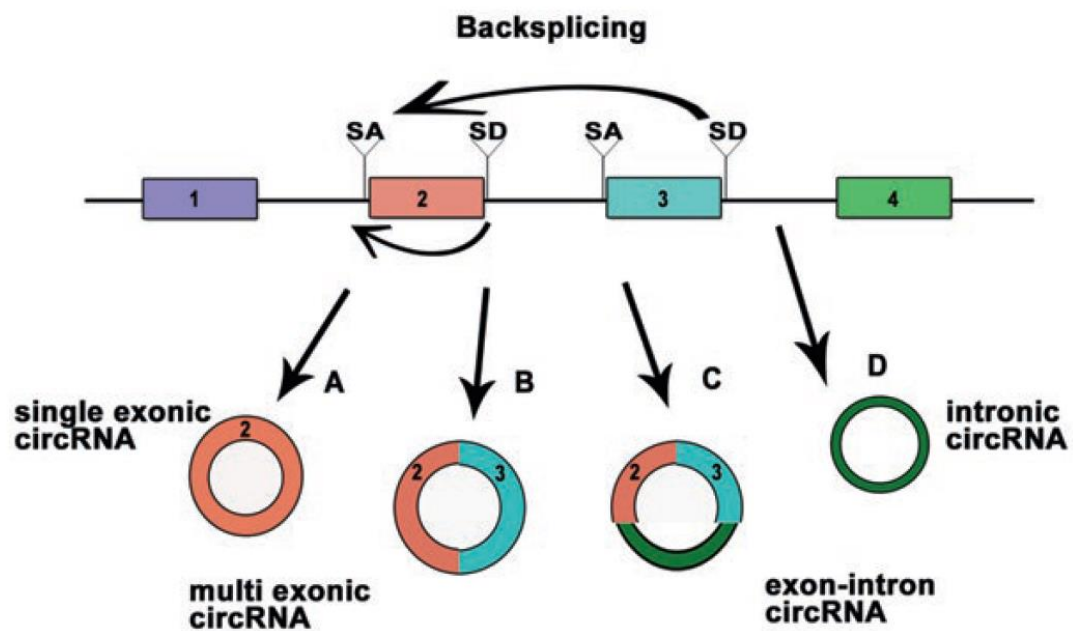


Figure 1 : Diversité des circRNAs. Les circRNAs sont issus de la circularisation d'un ou plusieurs exons et/ou introns via une liaison d'une extrémité 3' donneuse en aval (SD) et d'une extrémité 5' accepteuse en amont (SA). (A et B) EciRNAs (Exonic circRNAs) (C) EIciRNAs (Exons and Introns circRNAs) (D) IciRNAs (Intronic circRNAs) (Bose et Ain 2018).

1.2. Expression et localisation des circRNAs :

Il existe trois grands types de circRNAs dû à la constitution de ceux-ci. Un premier type de circRNAs sont les EciRNAs (Exonic circRNAs) (Figure 1A et 1B) uniquement composés d'exons. Les EciRNAs sont constitués de un à cinq exons (Eger et al. 2018). Le deuxième type de circRNAs sont ceux composés d'introns et d'exons et sont nommés EIciRNAs (Exons and Introns circRNAs) (Figure 1C) (Bose et Ain 2018). Pour finir, certains introns qui sont épissés peuvent se circulariser et former un circRNA nommé IciRNA (Intronic circRNA) (Figure 1D) (Eger et al. 2018).

La localisation des circRNAs est influencée par la composition de ceux-ci. Les circRNAs constitués d'un ou plusieurs introns sont localisés dans le noyau en lien avec la rétention des introns. En effet, la présence d'introns empêche les circRNAs d'être exporté hors du noyau par le même processus que l'ARNm épissé de manière incomplète. Les circRNAs constitués uniquement d'exons semblent être exporté pour se retrouver dans le cytoplasme (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017).

Les circRNAs sont exprimés au niveau de tissus spécifiques et sont très conservés entre espèces. Les circRNAs sont de très bons biomarqueurs car ils sont présents dans différents fluides corporels en quantité élevées et qu'ils sont stables (Kristensen et al. 2019). Par exemple, lors de cancers, certains circRNAs sont dérégulés et un profil spécifique d'expression peut être observé dans plusieurs cancers. Ils sont des éléments essentiels pour le diagnostic, le pronostic et la thérapie. Ils jouent aussi un rôle important dans la différenciation neuronale et dans beaucoup de pathologies neurologiques et cardiaques. Leur capacité à réguler l'expression de certains gènes font qu'ils sont également très étudiés en tant qu'outils thérapeutiques potentiels (Mumtaz et al. 2020).

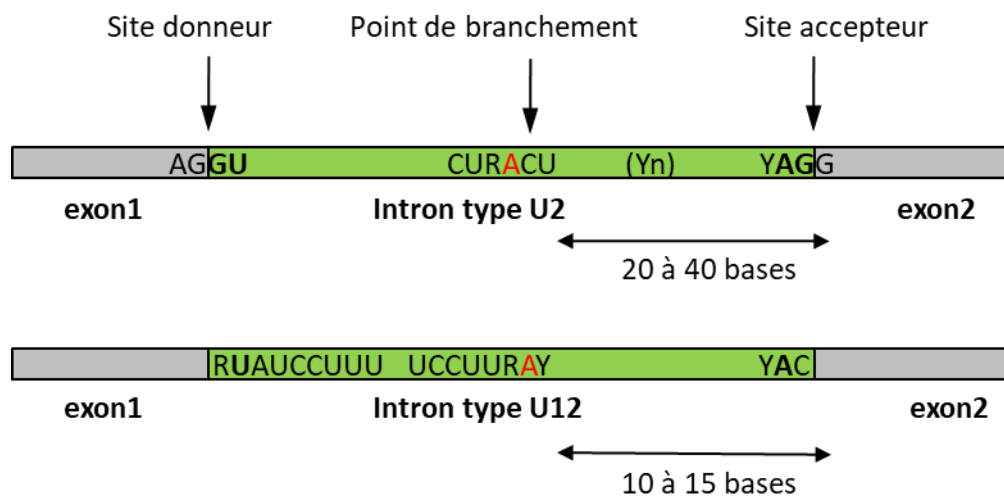


Figure 2 : Séquences consensus d'épissage reconnues par les spliceosomes de type U2 et U12. Les nucléotides en gras sont très conservés et l'adénosine en rouge est celle du point de branchement (Coupeau 2011).

1.3. Biogénèse :

Les circRNAs sont issus d'ARN pré-messager transcrits par l'ARN polymérase II de manière identiques aux autres ARNm matures. Cet ARN pré-messager subit un épissage (splicing) afin de devenir de l'ARN messenger. Pour les circRNAs, il existe deux hypothèses concernant leur biogénèse via l'épissage alternatif. La première se base sur le modèle du lariat, la seconde sur le modèle du backsplicing. Il existe une compétition entre l'épissage canonique et le backsplicing pour de nombreux gènes ce qui fait que les circRNAs sont majoritairement moins exprimés que leur homologues linéaires (Kristensen et al. 2019). Cependant, il existe certains circRNAs qui sont jusqu'à dix fois plus exprimé que leur forme linéaire (Wilusz 2018).

Les circRNAs introniques seraient issus principalement du modèle lariat tandis que ceux possédant des exons seraient générés de façon co-transcriptionnelle (Bose et Ain 2018).

Différents circRNAs peuvent être produits à partir d'un même gène via une circularisation alternative, via des sites d'épissages alternatifs ou via des sauts d'exons ou la rétention d'introns (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017). Il existe aussi des circRNAs possédant des exons qui n'existent pas chez les transcrits linéaires. En effet, une étude a montré que certains exons n'étaient présent uniquement que chez certains circRNAs et n'avaient pas été retrouvés chez des transcrits linéaires (X.-O. Zhang et al. 2016). Tous les types d'épissage alternatifs ont été retrouvés chez les circRNAs que ce soit la rétention d'introns, l'épissage alternatif en 5', en 3' ou l'épissage de type cassette.

1.3.1. L'épissage (splicing) :

L'épissage est l'un des processus qui permet de transformer l'ARN pré-messager en ARN messenger mature pouvant ainsi être traduit en protéine. Durant l'épissage, les introns sont éliminés grâce à une machinerie appelée spliceosome. Le spliceosome U2 dépendant est constitué de plusieurs ribonucléoprotéines regroupées en cinq complexes, U1, U2, U4, U5 et U6. Celles-ci sont des petites ribonucléoprotéines nucléaires (small nuclear ribonucléoproteins, snRNPs). Ces snRNPs sont constitués d'un petit ARN nucléaire (snRNA) et de protéines. Ces cinq unités interagissent de façon complexe et dynamique afin de se fixer sur les introns et de devenir actives (Lee et Rio 2015). Il existe également un spliceosome mineur, le spliceosome U12 dépendant, responsable d'un pourcentage de l'épissage, qui est formé par les snRNAs U11, U12, U5, U4atac et U6atac (Bartschat et Samuelsson 2010).

1.3.1.1. Séquences consensus :

La machinerie du spliceosome s'assemble au niveau des introns à épisser et sa composition varie durant le processus d'excision (Lee et Rio 2015). Le spliceosome va reconnaître des séquences spécifiques au niveau des sites d'épissages et au point de branchement (Figure 2). Au niveau du site donneur, la séquence reconnue est AG/GU, à l'extrémité accepteuse, la séquence est YAG/G et au point de branchement, il s'agit de CURACU. L'extrémité donneuse sera reconnue par U1 et l'extrémité accepteuse par U2. Pour le spliceosome U12, le fonctionnement est identique mais les séquences reconnues sont différentes. U11 va reconnaître en 5' la séquence /RUAUCCUUU, le point de branchement est UCCUUAACU et U12 reconnaît des séquences en 3' variables (Bartschat et Samuelsson 2010).

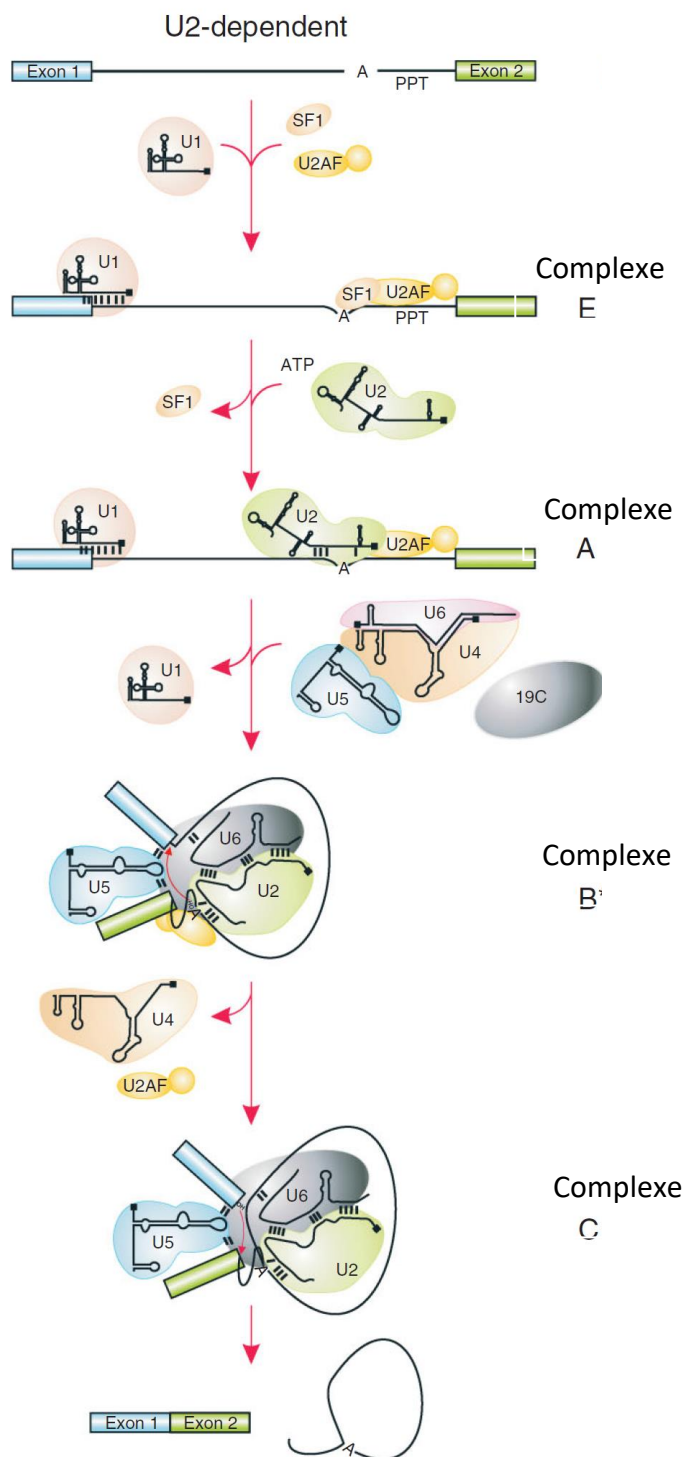


Figure 3 : Arrangement séquentiel du spliceosome de type U2. Les différentes interactions entre les snRNPs et les protéines permettant de rendre fonctionnelle la machinerie spliceosomale et permettant d'aboutir à l'épissage (Turunen et al. 2013).

1.3.1.2. *Le spliceosome :*

Le spliceosome est, comme dit précédemment, une machinerie composée de cinq sous-unités. Ces snRNPs vont interagir avec l'ARN pré-messager de manière séquentielle ainsi qu'avec d'autres protéines. Pour le spliceosome de type U2 (Figure 3), en premier lieu, U1 va interagir avec l'extrémité 5' de l'intron. Ensuite, le point de branchement est reconnu par SF1 (splicing factor 1) et l'extrémité 3' est reconnue par le facteur U2AF (U2 Auxiliary Factor). Cette première étape forme le complexe E. Le complexe A est formé en remplaçant SF1 par U2. L'association stable de U4/U6/U5 se lie à l'ARN pour former le complexe B. Un réarrangement a lieu pour former le complexe catalytique et U4 ainsi que U1 sont relargués. U6 et U2 vont interagir ensemble afin de permettre le rapprochement du site accepteur et du point de branchement permettant la première transestérification. La seconde transestérification a ensuite lieu via U5 et permet le rapprochement et la ligation des exons. Pour terminer, le spliceosome est démantelé et les snRNPs peuvent être de nouveau recrutées dans un nouveau processus d'un épissage (Turunen et al. 2013).

Pour le spliceosome mineur de type U12, sa composition diffère car il est composé de snRNPs spécifiques sauf U5 qui est commune aux deux types de spliceosome. Ces snRNPs ont des séquences totalement différentes de celles de leur homologue du spliceosome majeur mais elles ont des structures similaires. Pour le mode de fonctionnement, les deux spliceosomes se ressemblent fortement (Turunen et al. 2013).

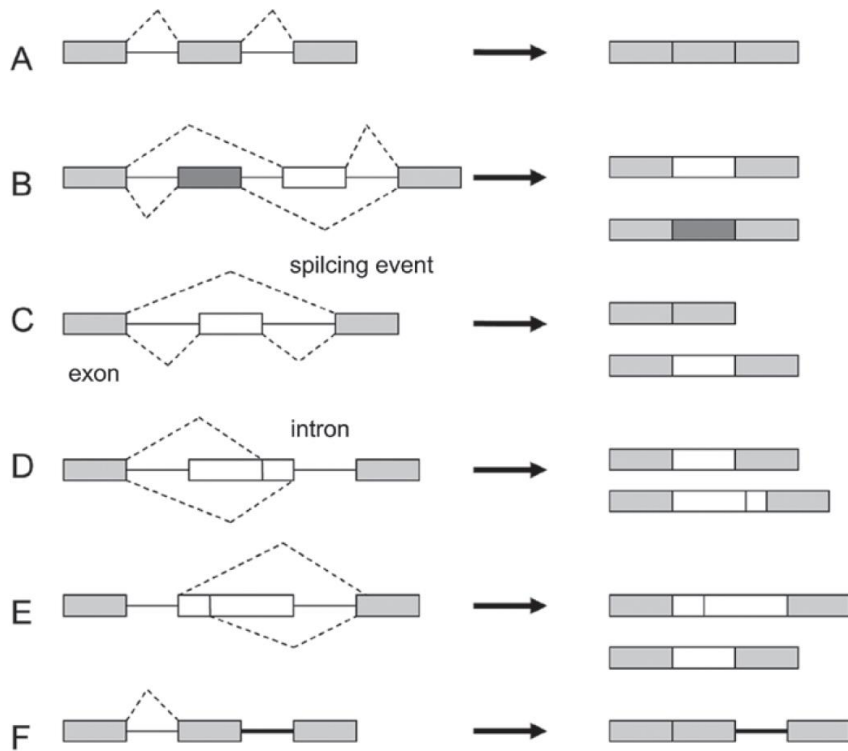


Figure 4 : Principaux types d'épissage alternatif. Chaque illustration représente un type d'épissage alternatif. (A) Epissage canonique où les introns sont épissés. (B) Exons mutuellement exclusifs où un exon est présente uniquement si l'autre est absent. (C) Epissage de type cassette où un exon peut être épissé ou non. (D et E) Sites d'épissage cryptiques en 3' (D) et 5' (E) où il existe deux possibilités d'épissage permettant d'avoir tout l'exon ou une partie en moins. (F) Rétention d'intron où un intron est retenu lors de l'épissage (Wang et al. 2015).

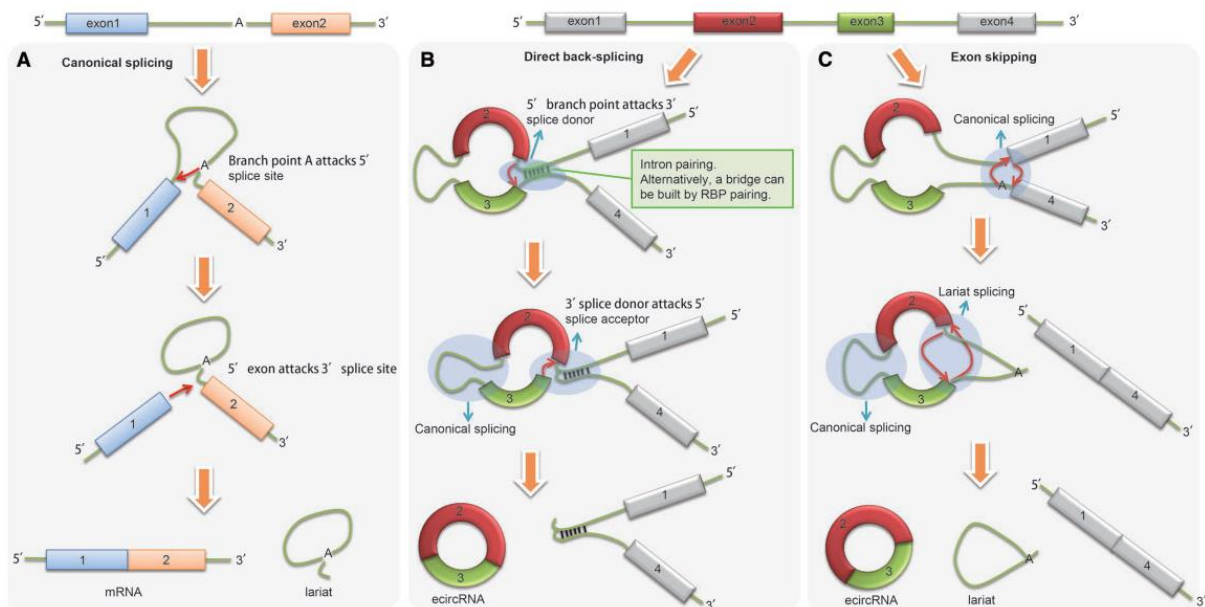


Figure 5 : Modèle de formation des circRNAs via l'épissage. (A) Epissage canonique. (B) Epissage de type backsplicing. Épissage intervenant en premier lieu et permettant la création de circRNAs. Cet épissage est favorisé par les ICS. (C) Epissage de type lariat ou exon skipping. L'épissage a lieu au sein du lariat dans un second temps (Meng et al. 2016).

1.3.1.3. *L'épissage alternatif :*

L'épissage alternatif est le moyen utilisé par les cellules afin d'avoir un nombre de protéines supérieur au nombre de gènes. Environ 95% des gènes chez l'homme subissent un épissage alternatif et donc codent pour plus d'une protéine. Il existe cinq mécanismes principaux d'épissage alternatif (Figure 4) qui sont les exons mutuellement exclusifs, l'épissage de type cassette, la rétention d'introns et l'épissage sur site cryptique en 3' ou en 5' (Wang et al. 2015).

L'épissage alternatif avec les exons mutuellement exclusifs (Figure 4B) est un épissage qui permet de sélectionner l'un ou l'autre exon et qu'un ARNm ne se retrouve jamais avec ces deux exons (Baralle et Baralle 2018).

L'épissage de type cassette (Figure 4B) est un épissage qui permet l'inclusion ou l'exclusion d'un exon. Ce phénomène se produit de façon variable (Baralle et Baralle 2018).

La rétention d'introns (Figure 4D) est possible lorsque le spliceosome voit son efficacité diminuée. Ce phénomène existe chez la plupart des gènes humains et est induite par une absence de reconnaissance des sites d'épissage canoniques. Les introns retenus semblent être plus courts et posséder un fort pourcentage de GC. Certaines protéines de liaison à l'ARN peuvent aussi jouer dans ce processus en empêchant la reconnaissance du site d'épissage (Sibley, Blazquez, et Ule 2016).

Les sites d'épissages cryptiques (Figures 4E et 4F) sont des sites où les séquences sont similaires aux séquences des sites d'épissage canoniques. Lorsque ces séquences sont présentes dans le génome, elles permettent en général d'induire un décalage du cadre de lecture ou d'introduire un codon STOP prématurément (Sibley, Blazquez, et Ule 2016).

1.3.1.4. *Le backsplicing :*

Le backsplicing direct est l'épissage permettant la formation des circRNAs à partir de pré-ARNm (Figure 5B). Il s'agit d'un épissage arrière pouvant se produire avec un seul exon ou entre un exon en aval qui va se lier avec un exon en amont, les introns pouvant être ou non épissés (Sibley, Blazquez, et Ule 2016). Le backsplicing utilise les séquences spécifiques d'épissage et le spliceosome mais l'extrémité 3' d'un exon se lie avec une extrémité 5' en amont. Cet assemblage conduit à un ordre d'exons inversés par rapport à au gène de départ (Eger et al. 2018). Il a été rapporté que bien souvent les circRNAs produits sont entourés de longs introns qui permettront de rapprocher les sites d'épissage (Hsiao, Sun, et Tsai 2017; Santer, Bär, et Thum 2019).

Un second modèle d'épissage permettant la formation des circRNAs existe, le modèle lariat (Figure 5A). L'épissage canonique a lieu en premier pour ensuite laisser place à la formation de circRNAs tandis que lors du backsplicing direct, la formation de circRNAs a lieu en premier (Eger et al. 2018). Le modèle lariat est un épissage secondaire des exons non intégrés, où ces exons se retrouvent dans le lariat. (Hsiao, Sun, et Tsai 2017). Cette liaison est en temps normale détectée par les exonucléases et le lariat est alors linéarisé puis dégradé (Eger et al. 2018). Cependant, lors de la formation des circRNAs, une étape de backsplicing interne intervient avant que la machinerie du spliceosome se détache de la partie excisée. Le processus permettant de promouvoir la formation de ces circRNAs est encore inconnu bien qu'une séquence de 7 nucléotides riche en GU au niveau 5' et un motif de 11 nucléotides riche en C au niveau du point de branchement pourrait le promouvoir (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017; Qu et al. 2015).

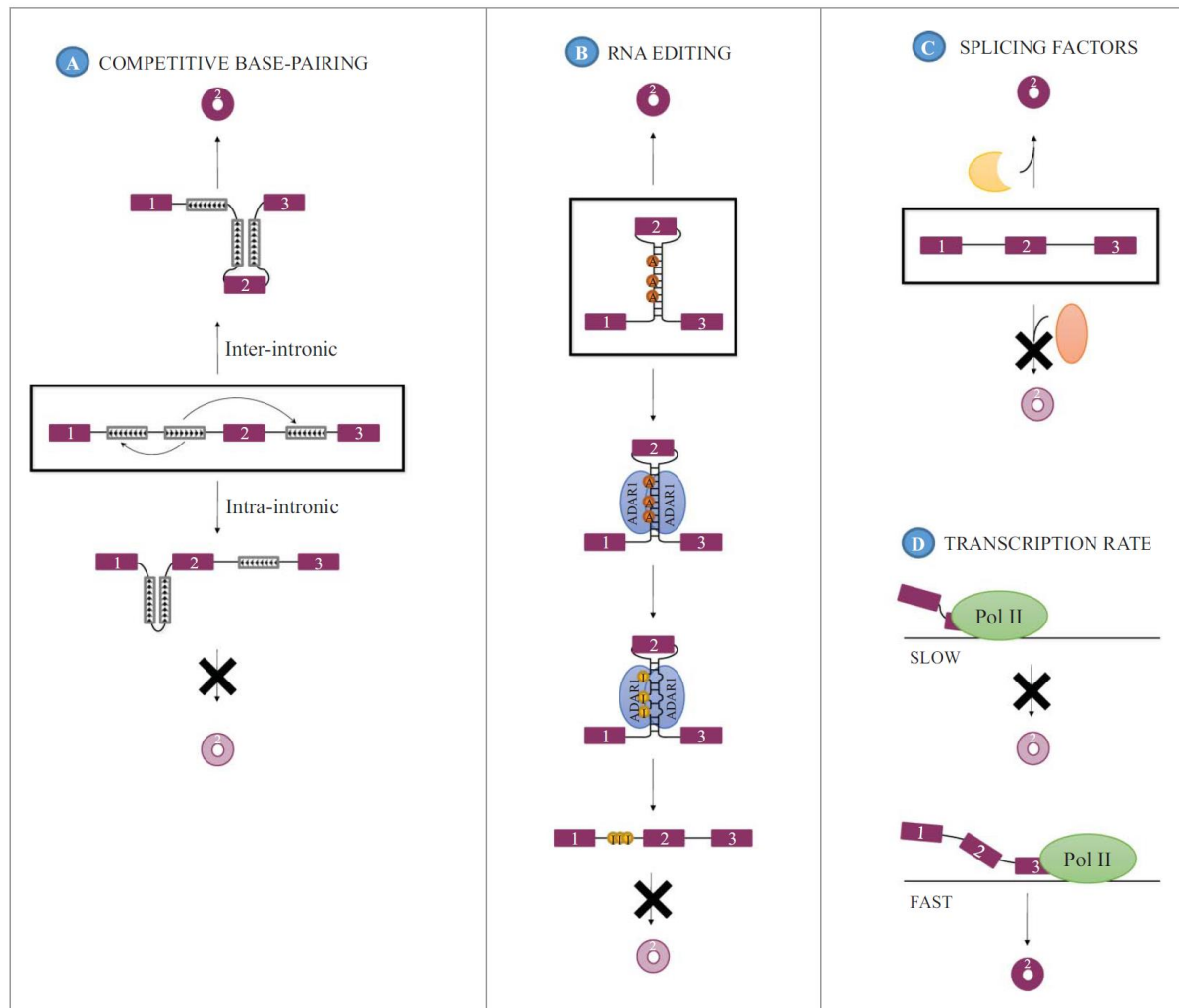


Figure 6 : Eléments régulateurs de la formation des circRNAs. (A) ICS permettant le rapprochement des exons induisant la circularisation lorsqu'ils sont sur des introns distincts. (B) Formation des circRNAs empêchée par ADAR I qui modifie les adénosines (A) en inosines (I). (C) Facteurs d'épissage influençant la formation de manière favorable ou non. (D) Formation des circRNAs influencée par la vitesse de l'ARN polymérase (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017).

1.4. Régulation des circRNAs :

La formation des circRNAs peut être facilitée via des séquences complémentaires introniques (ICS) (Figure 6A). Ces ICS sont des séquences nucléotidiques qui permettent de rapprocher les extrémités des exons qui seront circularisés (Kristensen et al. 2019). Ces ICS se trouvent au niveau des introns avant et après les exons circularisés et permettent de former un lasso (Eger et al. 2018). En effet, un appariement de ces nucléotides favorise la circularisation au détriment d'un épissage linéaire. Ce mécanisme semble assez utilisé pour la formation des circRNAs. Ces ICS doivent avoir une taille minimale de 30 à 40 nucléotides et la formation des circRNAs va dépendre de la force des liaisons nucléotidiques et de la complémentarité des séquences (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017). Les ICS peuvent modifier l'efficacité de production des circRNAs en fonction de leur séquence, par exemple, les séquences contenant des régions poly (A) peuvent inhiber la circularisation dû à leurs faibles interactions. De plus, les ICS semblent plus que nécessaire pour les exons longs afin de permettre le rapprochement de leurs extrémités. Il a également été montré que la suppression d'une des séquences élimine la production de circRNAs. Ces ICS suggèrent qu'il est nécessaire d'avoir un rapprochement des sites d'épissage afin de générer des circRNAs via le backsplicing. Dans ce cas, la formation des circRNAs semblent être un processus plus lent que la formation d'ARN linéaires car il nécessite un rapprochement et appariements des séquences (Liang et Wilusz 2014).

La formation des circRNAs est également régulée par les facteurs trans et les éléments cis régulateurs (Figure 6C). Ils jouent sur l'efficacité du backsplicing. Les protéines de liaisons à l'ARN (RBP, RNA binding protein) peuvent faciliter la formation des circRNAs. En effet, elles vont se lier au niveau des éléments cis de l'ARN et stabiliser le complexe permettant l'épissage. Ces protéines vont agir de la même manière que les ICS et vont permettre de rapprocher les extrémités du circRNAs. C'est le cas de la protéine QKI (Quaking) qui se lie à des séquences cibles au niveau des introns flanquants et va après dimérisation avec elle-même, permettre un rapprochement des bornes permettant la recircularisation. D'autres protéines vont, cependant, avoir l'effet inverse et inhiber la formation des circRNAs. C'est le cas d'ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA) (Figure 6B) qui va modifier les nucléotides de A vers I et diminuant ainsi la complémentarité des ICS, empêchant la formation d'un circRNAs (Li, Yang, et Chen 2018).

L'expression des circRNAs va dépendre de l'élongation transcriptionnelle, plus la polymérase sera rapide plus le taux de formation des circRNAs est important (Figure 6D). Il a été démontré que les gènes précurseurs de circRNAs sont transcrits plus rapidement (2,9 kb/min) que les gènes n'en produisant pas (2,29 kb/min). Il y a donc une concurrence entre la formation d'ARN linéaires et circulaires et la vitesse de transcription va favoriser l'une ou l'autre forme. L'élongation rapide de la polymérase II permet de faciliter l'appariement des bases entre introns flanquants et empêche la régulation du saut d'exons ce qui augmente son apparition (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017).

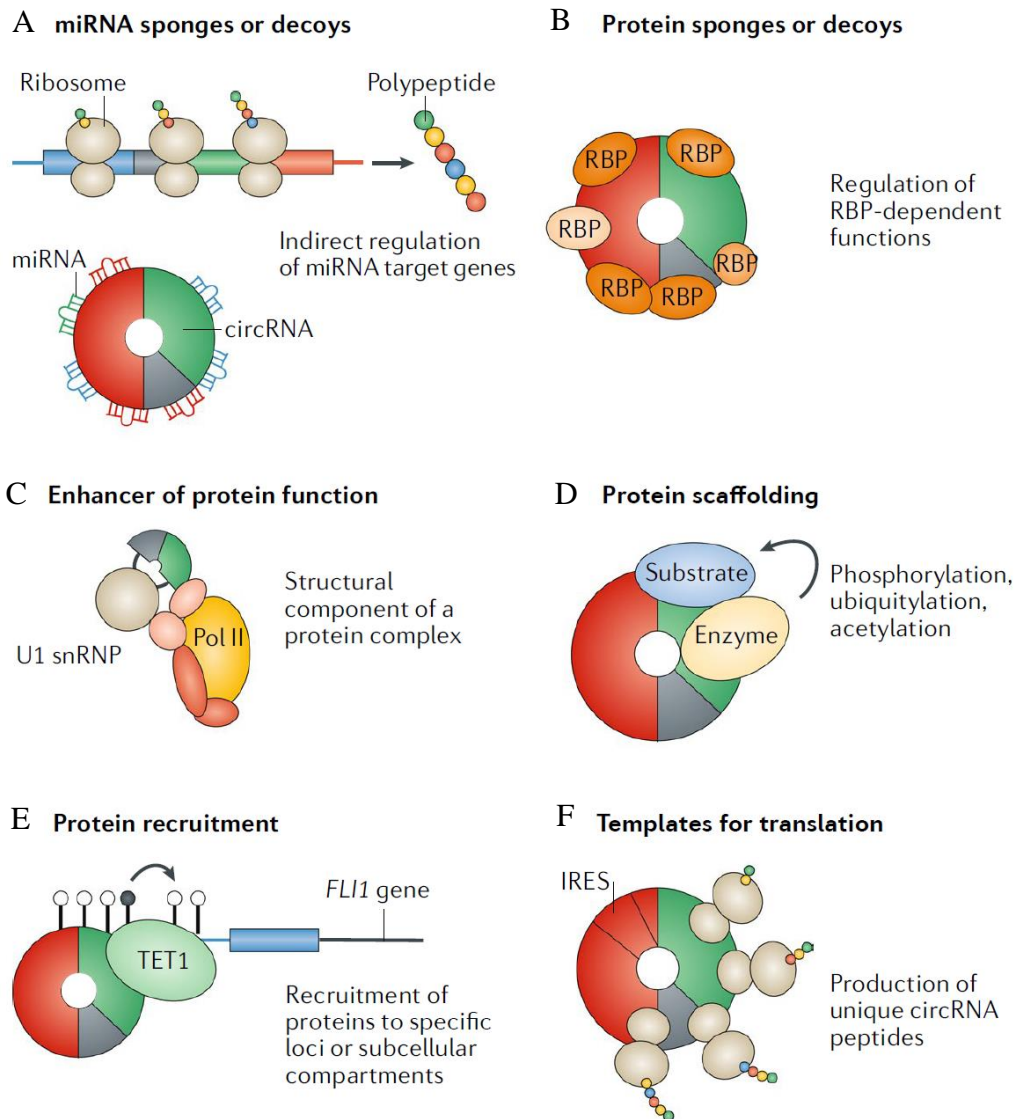


Figure 7 : Différentes fonctions des circRNAs. (A) Les circRNAs peuvent agir comme des éponges à miRNAs permettant de protéger l'ARNm. (B) Ils agissent comme des éponges à protéines. (C) Ils peuvent améliorer le fonctionnement d'un complexe comme par exemple l'ARN pol II et U1. (D) Ils peuvent favoriser l'interaction entre deux protéines différentes. (E) Ils peuvent aider au recrutement de certaines protéines. (F) Ils peuvent être traduits en protéine (Kristensen et al. 2019).

1.5. Fonctions des circRNAs :

Les circRNAs peuvent jouer de nombreux rôles tels qu'éponge à micro RNAs (miRNAs), régulateur de gènes, ils peuvent également être traduits (Figure 7) ... Ils interviennent à tous les niveaux de régulation cependant existe encore des zones d'ombres concernant le fonctionnement exact.

1.5.1. Eponges à miRNAs :

Les miRNAs sont des petit ARNs non-codants constitué de 21 à 24 nucléotides. Ils agissent en tant que régulateurs de gènes via la liaison de séquences cibles, ils inhibent la traduction et favorisent la dégradation. Ils sont issus d'un précurseur en forme d'hairpin, le pri-miRNA. L'hairpin est traitée par Drosha afin de produire le pré-miRNA qui est exporté dans le cytoplasme. Au sein de celui-ci, Dicer coupe le pré-miRNA afin de laisser un ARN double brin. L'un des brins sera dégradé, le second s'associe à la protéine Argonaute afin d'agir comme régulateur soit en dégradant l'ARN cible soit en inhibant sa traduction. La partie fonctionnelle d'un miRNA, la seed sequence, se situe à l'extrémité 5' et est constituée de 8 nucléotide (Santer, Bär, et Thum 2019).

Certains circRNAs possèdent un à plusieurs sites de liaison pour les miRNAs et agissent comme des éponges à miRNAs (Figure 7A) ou comme réservoir de ceux-ci. Ces circRNAs sont des circRNAs exoniques et sont localisés dans le cytoplasme. Un circRNA peut posséder un ou une multitude de sites de liaisons pour un miRNA. Par exemple, le circRNA ciRS-7, exprimé dans le cerveau, possèdent plus de 70 sites de liaison pour miR-7 ainsi qu'un site de liaison pour miR-671. Il y a donc une séquestration de miR-7 importante mais lorsque miR-671 intervient, il dégrade ciRS-7. Lorsque ciRS-7 est dégradé tous les miR-7 sont relargués et peuvent intervenir au niveau de son ARN cible. Ce qui démontre la double fonction des circRNAs. Un circRNA peut, également, posséder des sites de liaison pour différents miRNAs, ceux-ci étant impliqué dans l'inhibition d'une même voie de signalisation. Cette liaison des miRNAs aux circRNAs les empêchent de jouer leur rôle de régulateur, les circRNAs agissent donc en inhibiteurs de miRNAs (López-Jiménez, Rojas, et Andrés-León 2018; Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017; Hansen, Kjems, et Damgaard 2013).

1.5.2. Régulateur de gènes :

Une majorité des circRNAs identifiés au sein du noyaux possèdent un rôle dans la régulation génique. En effet, ils peuvent promouvoir la transcription en modulant l'activité de l'ARN polymérase II (López-Jiménez, Rojas, et Andrés-León 2018). Certains circRNAs vont rester au niveau du promoteur de leurs propres gènes parentaux et vont ainsi augmenter la transcription en interagissant avec U1 du spliceosome (Figure 7C). Les circRNAs peuvent également jouer un rôle dans l'expression génique en recrutant des modulateurs épigénétiques. Ils peuvent également modifier l'épissage de certains gènes, il a été découvert que certains gènes n'étaient plus épissés en présence de circRNAs et qu'une corrélation existe entre le taux de circRNAs et l'épissage (Hsiao, Sun, et Tsai 2017).

Les circRNAs composés d'exons et d'introns vont jouer un rôle au niveau de l'initiation de la transcription. C'est lors de cette étape que la transcription va être influencée par les facteurs de transcription et que le complexe sera stabilisé. Il a été prouvé que la suppression de certains circRNAs interagissant avec l'ARN polymérase II diminuaient la transcription des gènes. Ces circRNAs ne se limitant pas uniquement à leurs gènes parentaux. C'est le cas, par exemple, du circEIF3J et du circPAIP2 qui lorsqu'ils sont précipités, précipitent également la sous-unité U1

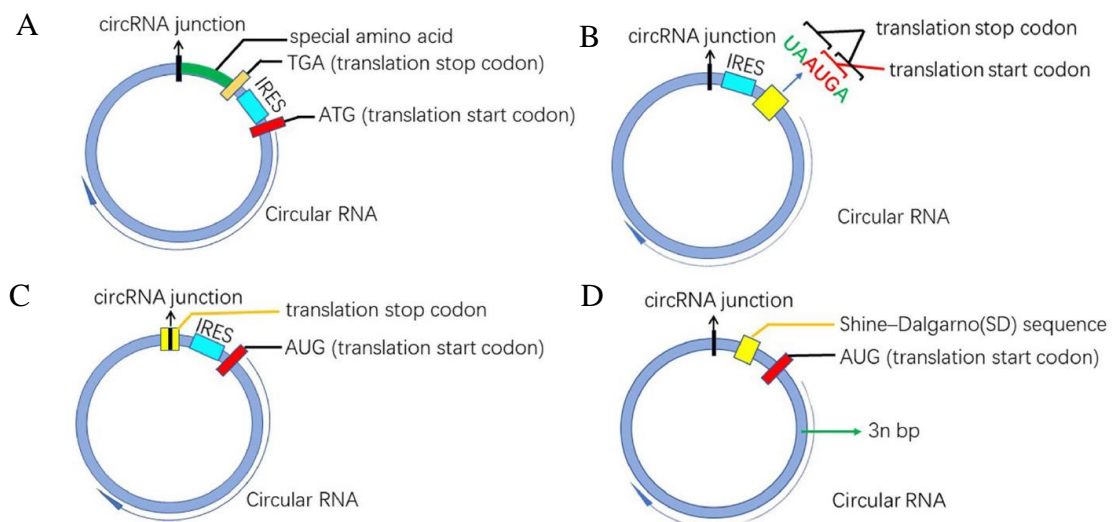


Figure 8 : Différents types de circRNAs traduits. Ces ORFs permettent de traduire les circRNAs en protéines (A) ORF standard débutant par un ATG et se terminant par un TGA. (B) Les codons start et stop sont générés par le backsplicing. (C) ORF constitué d'un codon AUG et le codon stop est généré par la back jonction (D) CircRNA sans ORF, possédant uniquement un codon Start (Shi, Jia, et Xu 2020).

du spliceosome ainsi que l'ARN pol II. Il reste cependant une zone d'ombre pour l'interaction des circRNAs et de l'ARN polymérase II concernant l'implication d'autres intervenants (Bose et Ain 2018).

Les circRNAs composés d'introns interviendront lors de l'élongation. Ces circRNAs interviennent principalement sur les gènes parentaux en augmentant le taux de transcription. Ces circRNAs semblent intervenir dans l'épissage provoquant une rétention d'introns au sein de l'ARNm lorsqu'ils sont inhibés. Cette rétention d'introns induit des codons STOP prématurés modifiant la séquence codante. Le circankrd52 est un bon exemple, lorsqu'il est inhibé une nouvelle isoforme d'ARNm est présente. Cet ARNm contient des introns possédant des codons d'arrêt ce qui provoque la dégradation de l'ARNm par le NMD (nonsense-mediated decay) (Bose et Ain 2018).

1.5.3. Interactions avec les protéines :

Certains circRNAs ont la capacité de se lier avec des protéines. Ils peuvent soit faciliter la liaison de protéines entre elles (Figure 7D), réguler la fonction de certaines d'entre elles (Figure 7E) ou avoir un rôle d'éponges et séquestrer la protéine (Figure 7B) (Kristensen et al. 2019; Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017).

Les circRNAs peuvent servir à séquestrer un type de protéine afin de constituer un réservoir. Cela permet à la cellule d'être préparée à un type de stimuli extérieur. La stabilité des circRNAs dans le temps permet d'avoir un réservoir de qualité. Une fois le stimuli arrivé les circRNAs sont dégradés ce qui permet un relargage de toutes les protéines séquestrées (Kristensen et al. 2019).

Un cas particulier existe avec la protéine MBL (musclebind) de la drosophile qui va s'auto-réguler via la génération d'un circRNA agissant comme éponges à protéines. La protéine MBL, lorsqu'elle est en quantité importante, va favoriser l'épissage de son gène afin de générer un circRNA appelé circMbl. La génération de ce circRNA va diminuer le taux d'ARNm et donc de protéine MBL. Ce circRNA contient des sites de liaisons permettant à la protéine de s'y lier et agit ainsi comme éponge. Cela permet de séquestrer la protéine et donc de favoriser de nouveau sa production (Bose et Ain 2018).

1.5.4. CircRNAs traduits :

Certains circRNAs peuvent être traduits en protéines (Figure 7F), cela avait été découvert en 1995 quand de longues chaînes de polypeptides se sont avérées être synthétisées par des circRNAs (Shi, Jia, et Xu 2020; Chang et Sarnow 1995). Pour cela, les circRNAs doivent posséder un IRES (internal ribosome entry site) et une ORF (cadre de lecture ouvert) (López-Jiménez, Rojas, et Andrés-León 2018). Depuis toutes ces années, de plus en plus de découvertes sont venues confirmer cette idée. En effet, certains circRNAs sont localisés dans le cytoplasme, lieu de la traduction. Ces circRNAs peuvent potentiellement s'associer aux ribosomes et la majorité de ceux-ci possèdent un IRES. L'IRES permet de recruter les ribosomes sur circRNAs. Cependant, en cas d'absence d'IRES un motif spécifique, "RRACH" (R = G or A; H = A, C or U), permettrait le recrutement de la machinerie de traduction (Shi, Jia, et Xu 2020). Ensuite, ces circRNAs doivent avoir une ORF, cette ORF diffère généralement de celle de l'ARNm. Les circRNAs possèdent quatre grandes sortes d'ORF (Figure 8). La première est identique aux ARNm, elle débute par ATG et termine par TGA (Figure 8A). Il existe un deuxième type où l'ORF est générée par la back jonction, cette liaison d'extrémités génère une séquence UGAUGA (UGA=Stop, AUG=Start) ou une séquence UAAUGA (UAA=Stop, AUG=Start) (Figure 8B). Ces séquences correspondent à des codons start et stop permettant aux ribosomes d'amorcer la traduction et de la terminer. Une autre sorte est constituée d'un codon start AUG

et le codon stop est généré par la back-jonction (Figure 8C). La dernière catégorie est constituée des circRNAs ne possédant pas d'IRES mais uniquement d'un codon Start permettant l'initiation de transcription et le codon STOP est généré par un décalage du cadre de lecture (Figure 8D) (Shi, Jia, et Xu 2020).

La traduction des circRNAs a trois effets possibles : inconnus, inhibiteur, de renforcement. Soit les circRNAs vont être traduits et la chaîne polypeptidique va intervenir aux niveaux de différentes voies de transduction du signal de manière inconnue. Soit la protéine traduite aura un effet inhibiteur en empêchant l'activation de la protéine de pleine longueur. Soit le circRNA va permettre d'augmenter la quantité de la protéine ce qui est assez rare. Deux méthodes sont retrouvées, soit la séquence d'acide aminé produite possède une partie similaire de la protéine et agit comme un leurre afin de protéger la protéine de pleine longueur de la dégradation. Soit la protéine issue de la traduction du circRNA aura exactement la même séquence que la protéine issue de l'ARNm, c'est le cas de l'oncoprotéine E7 de HPV (Human PapillomaVirus) qui peut être codée par le circE7 ce qui va induire la proliférations des cellules cancéreuses (Shi, Jia, et Xu 2020).

1.6. Les circRNAs chez les virus :

Les circRNAs ont été détectés dans de multiples types cellulaires et chez de nombreux organismes, allant du vers à l'homme, en passant par les plantes et les champignons. Récemment, des circRNAs ont été découverts chez différents virus à ADN double brin provenant de deux familles, la famille des Herpesviridae (Epstein Barr virus, virus de Kaposi, Murid gammaherpesvirus 68, rhesus macaque lymphocryptovirus) et des Papillomaviridae (human papillomavirus) (Ebbesen, Hansen, et Kjems 2017).

Le virus d'Epstein Barr (EBV) un virus oncogénique de la famille des Herpesviridae. Il s'agit d'un virus présent chez 90% de la population qui est dans la plupart des cas asymptomatique mais il persiste tout au long de la vie de son hôte. Des circRNAs ont été trouvés chez ce virus lors de ses phases de latence et de réactivation. Ces circRNAs ont une abondance élevée et sont parfois plus exprimés que des circRNAs cellulaires dont le rôle a été reconnu ce qui suggère un rôle de ceux-ci. Certains d'entre eux ont été retrouvés dans des tumeurs induites par le virus ce qui suggère également un rôle dans la formation de tumeurs. Pour ce qui est de leur potentiels rôles, il existe une grande diversité de circRNAs provenant de différents locus. Leur expression aux différents moments du cycle viral permet de leur attribuer une fonction durant les différents moments du cycle bien que pour l'instant ces rôles restent inconnus (Ungerleider et al. 2018). Pour l'instant, peu d'études sur ces circRNAs ont été effectuées afin de caractériser leur rôle. Cependant, le circRPMS1 a été étudié, il s'agit d'un circRNA issu du gène RPMS1. Il s'agit d'un circRNA dont l'abondance est plus élevée dans les tumeurs nasopharyngées, plus précisément, chez les patients ayant des métastases et son abondance est inversement liée à la survie du patient ce qui fait de lui un potentiel oncogène. Il est localisé dans le cytoplasme et le noyau. Il apparaît être une éponge à miRNAs au niveau cytoplasmique par le ciblage de miRNAs suppresseurs de tumeurs et il pourrait potentiellement être un régulateur de gène au niveau du noyau. Son rôle général est d'empêcher l'apoptose et d'induire la prolifération cellulaire (Liu, Shuai, et Xia 2019).

Un autre virus produit des circRNAs, c'est le virus de Kaposi (KHSV, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus) un herpesvirus humain provoquant des sarcomes. Différents circRNAs sont exprimés par le virus et jouent le rôle d'inhibiteur d'expression des gènes viraux permettant aux virus d'échapper au système immunitaire de son hôte. Ils existent également d'autres circRNAs jouant le rôle d'éponges à miRNAs et ciblant, par exemple, des miRNAs impliqués dans la voie de signalisation de p53 (Tagawa et al. 2018).

Les circRNAs ont été retrouvés chez les papillomavirus humains (HPV, human papillomavirus) qui sont des virus à ADN double brin. Ce virus est responsable de 5% des cancers chez l'Homme principalement au niveau anal, utérin, vaginal et pénien. Il s'agit d'un virus avec un fort épissage lui permettant de réguler son cycle de viral. Lors de l'analyse de son génome, un circRNA a été découvert issu de l'oncoprotéine E7. Il s'agit du circE7 qui représente 1 à 3% de la totalité de l'ARN E7. Ce circRNA code pour l'oncoprotéine du virus, cela a été prouvé en induisant des mutations au sein de circE7 au niveau des ATG retrouvés dans sa séquence. Lorsque le circE7 est transfecté au sein de cellules, la protéine est exprimée tandis que lorsque l'ATG est muté, la protéine n'est plus présente. Ce circRNA est localisé dans le cytoplasme (Zhao et al. 2019).

1.7. Le virus de la maladie de Marek :

La maladie de Marek est une maladie générant des lymphomes chez le poulet. Il s'agit d'une maladie ayant un impact économique au niveau du monde agricole et existant partout dans le monde. Son impact économique est d'un milliard de dollars par an (Couteaudier et Denesvre 2014). Cette maladie fut décrite la première fois en 1907 par Jozsef Marek. Il s'agit d'une maladie provoquée par un α -herpesvirus, MDV (Marek's Disease Virus). Ce virus est également appelé GaHV-2 (Gallid Herpesvirus type 2) ou virus de la maladie de Marek (Gennart et al. 2015).

La maladie est caractérisée par la formation de lymphomes chez les sujets atteints ainsi que la paralysie de ceux-ci aboutissant à la mort dans les 4 semaines pour les formes sévères. Les premiers signes permettant d'identifier la maladie sont des dysfonctionnements locomoteurs (Gennart et al. 2015). Il n'existe pas de transmission verticale mais dès l'éclosion les individus sont susceptibles d'être infectés (Boodhoo et al. 2016).

1.7.1. Cycle infectieux du virus :

L'infection provoquée par le virus se produit en quatre phases différentes (Figure 9) après l'inhalation par le poulet de poussière contenant le virus relargué par d'autres poulets via les follicules plumeux. GaHV-2 entre via les poumons et est phagocyté par les macrophages pour être transporté au niveau des tissus lymphoïdes secondaires où le virus va envahir les lymphocytes B et T via un contact cellule à cellule (Boodhoo et al. 2016). Les premiers symptômes apparaissent 2 à 7 jours après l'inhalation. La première phase est la phase de production précoce qui a lieu dans les tissus lymphoïdes secondaires tels que la rate et le thymus. Cette phase consiste en la réplication du virus dans les lymphocytes B. Ensuite la phase de latence commence, elle est caractérisée par la persistance du virus sans réplication dans les lymphocytes T. Cette phase apparaît 7 à 14 jours post-infection. La troisième phase est celle de la production tardive où le virus est réactivé dans les lymphocytes T. La dernière phase est la phase de transformation. Durant celle-ci, il y a une dissémination du virus dans les nerfs périphériques ainsi que les organes viscéraux aboutissant à des lymphomes et de la paralysie. C'est lors de la phase de production tardive que le virus se réplique au niveau des cellules épithéliales des follicules plumeux et qu'il est ainsi libéré dans l'environnement (Gennart et al. 2015; Couteaudier et Denesvre 2014).

1.7.2. Génome du virus :

Le génome du virus de Marek est un ADN linéaire double brin de 175 kb. Ce génome est composé de deux séquences principales, chacune entourée de séquences inversées répétées. Les deux séquences principales sont appelées séquence unique longue (UL/unique long) et séquence unique courte (US/unique short). L'UL est flanquée des séquences TRL (Terminal Repeat Long) et IRL (Internal Repeat Long) et l'US est flanquée des séquences TRS (Terminal Repeat Short) et IRS (Internal Repeat Short) (Figure 10A). Cet arrangement est similaire à d'autres α -herpesvirus infectant l'homme, tels que HHV-1 (herpes simplex virus 1) et HHV-2 (herpes simplex virus 2) (Couteaudier et Denesvre 2014). Les gènes core se retrouvent dans les régions uniques tandis que les gènes associés à la virulence et à l'oncogenèse se retrouvent dans les régions TRL et IRL (Figure 10A). Parmi ceux-ci *meq* codant pour une protéine du même nom, Meq (Marek's EcoRI-Q-encoded protein), le gène vIL-8 (viral interleukine 8), vTR et de nombreux microARNs (Nair 2013).

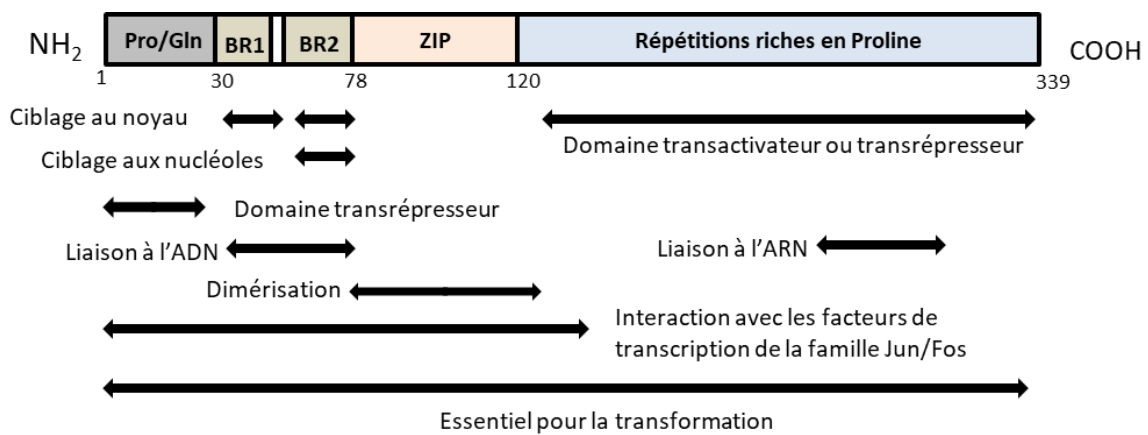


Figure 11 : Représentation des domaines de la protéine Meq. Représentation des différents domaines tels que la partie leucine zipper, le domaine d'homodimérisation, (Coupeau 2011)...

1.7.2.1. *Meq*

Le gène *meq*, situé dans les régions répétées entourant UL, code pour la protéine Meq qui est l'oncogène majeur du virus. Cette protéine est exprimée continuellement durant le cycle viral. Meq est composée de 339 acides aminés (Figure 11) et est localisée dans le noyau. Cette protéine possède, en région N-terminale, un domaine leucine zipper (bZIP, basic leucine zipper) similaires à d'autres protéines telles que c-Jun et c-Fos. Meq possède également une région riche en répétition de proline au niveau C-terminal, similaire à WT-1, un gène suppresseur de tumeur (Gennart et al. 2015; Kung et al. 2001; Venugopal 2000).

Meq agit comme un facteur de transcription et peut se dimériser avec elle-même ou avec d'autres facteurs de transcription de la famille des bZIPs. L'homodimère Meq/Meq et l'hétérodimère Meq/Jun, pour qui elle a une haute affinité, peuvent se lier aux séquences de la même manière que les protéines AP-1 (Qian et al. 1995; Kung et al. 2001).

Meq se lie spécifiquement à des séquences d'ADN appelées MERE (Meq response element). Les sites MERE I se situent au niveau des promoteurs viraux et d'interleukine cellulaire. Lorsque l'hétérodimère Meq/c-Jun s'y lie, il y a une activation de la transcription de gènes impliqués dans la réplication virale, tel que le gène ICP4 et dans la transformation cellulaire via par exemple IL-2 qui a un effet anti-apoptotique. Les sites MERE II sont ciblés par l'homodimère Meq/Meq qui lui a un effet répresseur sur l'expression des gènes intervenant dans la réplication virale, ce qui suggère un rôle dans la latence (Gennart et al. 2015; Coupeau 2011).

La région riche en répétitions de proline confère une propriété transactivatrice ou transrépressive. Il s'agit de deux répétitions et demie mais une seule répétition est essentielle pour la fonction de transactivation/transrépression (Kung et al. 2001).

Il s'agit également d'un gène subissant un fort épissage et qui se retrouve sous différents transcrits lors de l'infection virale (Figure 10B). Le rôle de ces différents transcrits n'est pas établi (Coupeau 2011).

1.7.2.2. *vIL-8*

vIL-8 est un gène composé de trois exons qui code pour une protéine. Cette protéine est impliquée dans la pathogénèse et semblent posséder un rôle chemoattractant afin d'attirer les lymphocytes pour qu'ils soient infectés par le virus. En effet, au cours de l'infection par le virus, à aucun moment celui-ci se retrouve dans sang et il se propage donc via le contact de cellule à cellule. *vIL-8* subit un épissage et il existe une expression de *vIL-8* et de *meq* (Figure 8b) où l'extrémité aminée de *meq* est reliée aux deux derniers exons de *vIL-8*. Cette protéine est exprimée lors de la phase lytique et lors de la phase de latence mais couplée au gène *meq* (Parcells et al. 2003; Nair 2013).

1.7.2.3. *MiRNAs*

Il existe dans les régions répétées 13 pré-miRNAs qui permettent l'expression de 25 miRNAs matures. Ces miRNAs sont exprimés par GaHV-2 durant l'infection. Ils existent trois grands groupes, dont le cluster miR (Figure 10A) en amont de Meq, appelé Meq-cluster où se trouvent les miRNAs M9, M5, M12, M3, M2 et M4. Les cibles de ces miRNAs ne sont pas exactement connues (Couteaudier et Denesvre 2014; Coupeau 2011). Le MDV-miR-M4 est connu pour cibler des transcrits cellulaires et viraux. Au niveau cellulaire, il possède la même séquence seed que le miR-155, impliqué dans la lymphogénèse et l'immunité. Ils ont donc tous les deux les mêmes cibles et régulent négativement la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'oncogène, (Zhuang et al. 2017)...

1.7.2.4. *LATs*

Au niveau des régions TRS et IRS se trouvent les gènes LATs (latency associated transcript). Les LATs sont de longs ARNs non codants qui sont exprimés lors de la latence ce qui suggère un rôle dans le maintien de celle-ci ou dans la transformation cellulaire. Ils sont composés de 15 exons et ils existent une diversité de transcrits ce qui leur donne autant de rôles possibles. Il existe également un cluster de miRNAs associés à cette région (Gennart et al. 2015; Coupeau 2011).

2. Objectifs

Le virus de la maladie de Marek est un modèle utilisé principalement pour l'étude des lymphomes viro-induits et des herpesvirus. Il s'agit d'un virus également fort étudié pour son impact économique au niveau mondial ainsi que ses nombreux mécanismes de régulation transcriptionnelle, de plus, la taille de son génome permet une étude assez facile. Ils restent, cependant, de nombreuses interrogations quant à son pouvoir oncogène et à son mode de fonctionnement lors de son cycle infectieux. Les circRNAs, récemment découvert chez différents virus de la famille des herpesvirus, exprimés principalement lors des phases lytiques et réactivées de l'infection virale, semblent être de possible intervenant. De plus, il existe un haut taux d'épissage au sein du génome de GaHV2, surtout au niveau des régions inversement répétées. Ce haut taux d'épissage permet de penser que des circRNAs pourraient être produit par ce virus et être impliqué dans la régulation du cycle infectieux.

L'objectif principal de ce mémoire est d'explorer l'expression et le rôle des circRNAs issus de la région IRL du génome du virus de la maladie de Marek. La recherche s'est principalement focalisée sur le gène *meq* représentant l'oncogène majeur du virus. L'étude s'est focalisée sur l'expression de ces circRNAs et leur abondance. La recherche s'est articulée autour de différentes questions : (a) Est-ce que GaHV-2 exprime des circRNAs provenant de la région du gène *meq* ? (b) Est-ce que les circRNAs provenant du gène *meq* sont exprimés à un stade spécifique du cycle viral ? (c) Est-il possible de créer un vecteur d'expression induisant la production de circRNAs provenant du gène *meq* sans infection virale ? Ce vecteur d'expression est-il utilisable avec d'autres gènes ? (d) Quel est le rôle potentiel des circRNAs ? (e) Est-il possible de quantifier l'abondance des circRNAs ?

Afin de répondre aux différentes questions, en premier lieu, une méthode d'identification des circRNAs a été mise en place afin de pouvoir obtenir la meilleure méthode permettant de mettre en évidence les circRNAs du virus de la maladie de Marek. Ensuite, une recherche des différents circRNAs provenant de l'oncogène majeur du virus a été effectuée. Ces circRNAs ont été analysés et séquencés afin d'obtenir leur profil d'expression. Une analyse des circRNAs au cours du cycle viral a été réalisée. Un modèle de vecteur d'expression a été réalisé et testé avec différents gènes de GaHV-2 afin de créer un modèle artificiel induisant la production de circRNAs. Afin d'étudier l'abondance des transcrits, une mise au point de technique de northern blot a été réalisée et pour terminer, une analyse bio-informatique a été faite afin de découvrir un rôle potentiel du circRNA.

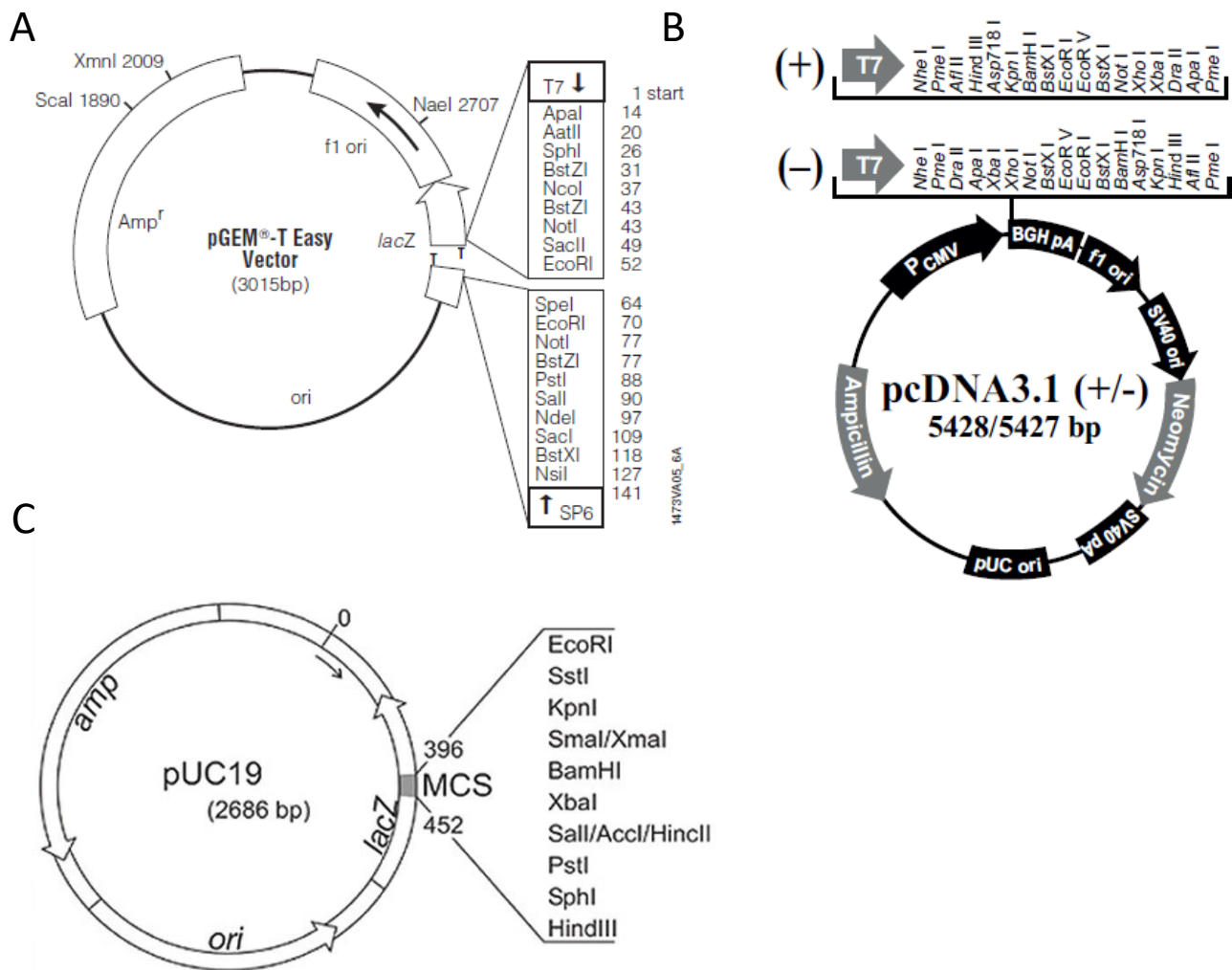


Figure 12 : Carte des vecteurs (A) pGEMT-easy, (B) pcDNA3.1 et (C) pUC19.

3. Matériels et méthodes

3.1. Lignées cellulaires :

3.1.1. DF1

Les DF1 sont des fibroblastes de poulet isolés à partir de cellules embryonnaires. Ces cellules adhérentes ne sont pas infectées par GaHV-2. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS). Les cellules sont cultivées à 41 °C avec 5% de CO₂. Les passages sont effectués lorsque les cellules sont confluentes.

3.1.2. MSB1

Les MSB1 sont des lymphocytes T CD4 + isolés d'un poulet infecté de manière latente par GaHV-2 BC-1. Ces cellules dérivent d'un lymphome de la rate. Ces cellules sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI additionné de 10% de FBS, 5% de sérum de poulet (CS), 25 mM d'HEPES (4- (2-HydroxyEthyl) -1-PiperazineEthaneSulfonic acid), 1% de NEAA (acide aminé non essentiel), 1% de PS (pénicilline streptomycine). Les cellules sont cultivées à 41 °C avec 5% de CO₂. Des passages sont effectués tous les deux jours.

Les MSB1 sont traités avec du butyrate de sodium (NaBu) 0,3M ou de la 5 Azacitidine (5'Aza) 5µM pour induire la réactivation virale. Les cellules sont récoltées 48 heures après le traitement.

3.1.3. ESCDL1

Les ESCDL1 (Embryonic Stem Cell Derived Line 1) sont des cellules de poulet dérivées de cellules mésenchymateuses sensibles à l'infection par GaHV-2 et qui soutiennent la réplication virale. L'infection est induite par la souche GaHV-2-RB1B. Ces cellules ont été développées par Vautherot et al (Vautherot et al. 2017). Les cellules adhérentes sont cultivées dans du DMEM additionné de 10% de FBS, 1% de PS. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂. Le passage des cellules est effectué lorsqu'elles sont à 85% de confluence atteinte.

3.2. Vecteurs :

Le plasmide pGEM-T Easy (Promega) (Figure 12A) est utilisé pour le clonage de produit de PCR. Ce plasmide possède LacZ permettant un criblage des colonies possédant un insert.

Le plasmide pcDNA3.1(-) (Figure 12B) permet l'expression d'insert clonés.

Le plasmide puc19 (Figure 12C) permet l'expression de gène et la transcription in vitro via la T7 polymérase puisqu'il ne possède pas cette séquence de façon constitutive.

3.3. Extraction d'ARN :

Afin de collecter les ARNs cellulaires, le Tri Reagent est utilisé pour l'extraction. Les cellules sont récupérées et centrifugées 7 min à 300 g. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé dans du PBS puis de nouveau centrifugée de la même façon. Ensuite, le culot cellulaire est resuspendu dans 100 µl de PBS et 1 ml de Tri Reagent (1 ml pour 5 à 10 x 10⁶ cellules) est ajouté. Après 5 min d'incubation à température ambiante (RT), 200 µl de chloroforme / ml de Tri Reagent sont ajoutés. Le mélange est vortexé puis incubé à température ambiante pendant 15 min. Après une étape de centrifugation pendant 15 min à 12000g à 4 ° C, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et l'ARN est précipité avec 1 mL d'isopropanol. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante et centrifugé 10 min à 12 000 g à 4 ° C. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% et centrifugé 5 min à 7500 g à 4 ° C. Le surnageant est

Tableau 1 : Liste des primers utilisés.

Nom	Séquence 5'-3'
A15 Rev meq circ	GTGCCCCGCTTCTCCCTGGTATAC
818B For meq circ	CACCCCTTCCCTGACGGCCTATC
475 Rev 14kdb circ	GACGTTGATGGAGGAGTTGC
M834 For 14kDb circ	GTCGATTGACACGGCTCTG
Rev circRNA5773	GTCTGGGCTGGAAAGACGAC
For circRNA5773	CTCAAGCAGCATTTTGGGACC
Rev WT	GCATAAGCTTGAGATCAATCGTGTTGTTTCCTTACG
For WT	GCATGCTAGCAGGTTGGTGCTGGAATGTTAAG
Rev Mut prot	CGGAGCGCCCGGCTCTGGCTCCTGAGACGGCTCTTTACACC
For Mut prot	CCGTCTCAGGAGCCAGAGCCGGGCGCTCCGCCCTACAGTCCCG
Rev Mut circ	GCATTAACCTTAACCTCGCTAAAGGTTTCGCTTATTCC
For Mut circ	CTTAGCGAGTTAAGGTTAATGCAGTCTCGTATAATTCCG
Rev Meq circ maj NotI	GCATGCGGCCGCATCTGCTAAAGGTTTCGCTTATTC
For Meq circ maj xbaI	GCTATCTAGAGTGTATACCAGGGAGAAGGC
Rev Meq notI	GCATGCGGCCGCGAGATCAATCGTGTTGTTTCCTTACG
For Meq xbaI	GCATTCTAGAAGGTTGGTGCTGGAATGTTAAG
501 Rev lat ex9 circ	CGTAAACTGGAAGATGAGGAC
502 For lat ex9 circ	ATGAAGAGGATGGCGATCTGG
For circ meq maj sonde	AGTCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGTCTGGCTCCTGAGACATCTCTT
Rev circ meq maj sonde	AGTCGGATCCATGGACATTCGGATGTAAAAGG
For meq lin sonde	AGTCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGGACGTGCACTCAGTCCTTAGAT
Rev meq lin sonde	AGTCGGATCCCAGACGGAATATGTAGACAAAC
For meq exon sonde	AGTCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGG CTTCCTGCGTCTTCTCCGAG
Rev meq exon sonde	AGTC GGATCC AGCCCTCCAAACACCCCTTC

éliminé et le culot est séché à 37 ° C. Ensuite, il est remis en suspension dans de l'eau Nuclease Free.

3.4. Traitement DNase :

Un traitement à la DNase est effectué pour éliminer les traces d'ADN. L'ARN (10 µg) est incubé pendant 10 min à 37 ° C avec 2 U de DNase I, 10 µl de tampon de réaction DNase I (10X) et de l'eau pour atteindre 100 µl. L'enzyme est ensuite inactivée 10 min à 75 ° C.

3.5. Traitement phénol/chloroforme :

Une purification au phénol / chloroforme est réalisée après chaque réaction enzymatique. L'ARN est dilué pour obtenir 300 µl de volume initial. 300 µl de mélange phénol / chloroforme / alcool isoamylique (24/25/1) sont ajoutés à la dilution d'ARN, vortexé et centrifugés 15 min à 13000 g à 4 ° C. La phase aqueuse est ajoutée à 300 µl de chloroforme / alcool isoamylique (49/1). Le mélange est à nouveau centrifugé. La phase aqueuse est récupérée et mélangée avec 600 µl d'éthanol 100% et 100 µl d'acétate de sodium 3M. Le tube est conservé une heure à -80 ° C. Une autre centrifugation est effectuée pendant 20 min à 14000 g à 4 ° C pour obtenir un culot. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% et une dernière centrifugation est effectuée pendant 5 min à 7500 g à 4 ° C. L'éthanol est éliminé et le culot est séché à 37 ° C pendant 5 min, puis il est remis en suspension dans de l'eau Nuclease Free.

3.6. Traitement RNase :

Afin de ne sélectionner que les ARN circulaires, un traitement à la RNase peut être réalisé avec la Ribonucléase R (Lucigen). Ce traitement vise à digérer tous les ARN à l'exception des structures circulaires et lariat. L'ARN est mélangé avec 20 U de l'enzyme RNase R et 10 µl de tampon de réaction RNase R (10X) et de l'eau pour atteindre 100 µl. Le mélange est incubé une heure à 37° C.

Ensuite, un phénol / chloroforme est à nouveau réalisé. Le culot d'ARN est remis en suspension dans 10 µl d'eau pour être rétro-transcrit.

3.7. Rétrotranscription :

La rétrotranscription permet d'obtenir de l'ADNc à partir d'ARN en utilisant de SuperScript III. L'ARN (5 µg) est mélangé avec 100 ng de random primers (hexamères) et 1 µl de dNTPs (10 mM chacun). Le mélange est incubé 3 min à 94 ° C puis 1 min sur glace. 4 µl de tampon First-Strand (5X), 1 µl de DTT 0.1M, 40 U de RNase OUT et 200 U de SuperScript III (SSIII, Invitrogen) sont ajoutés au mélange. Le tout est incubé 5 min à 25 ° C puis une heure à 50 ° C. Ensuite, la réaction est inactivée pendant 15 min à 70 ° C. 2 U de RNase H sont ajoutés, afin de dégrader les ARNs des complexes ARN/ADN et le mélange est incubé 20 min à 37 ° C.

3.8. PCR :

La PCR est utilisée pour amplifier des fragments d'ADNc. La GoTaq DNA Polymerase (Promega) est utilisée. Le mélange est composé de 4 µl de tampon GoTaq Green, 0,6 µl de dNTPs (10 µM de chacun), 0,5 U de GoTaq DNA Polymerase, 2 µl d'amorce sens (2 µM) (Tableau 1) et 2 µl d'amorces inverses (2 µM), 1 µl de cDNA et de l'eau pour obtenir 20 µl.

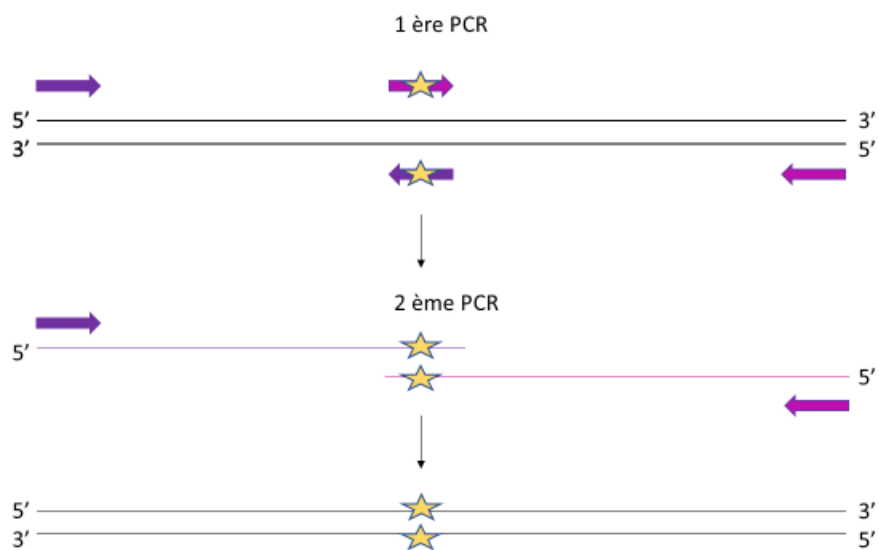


Figure 13 : Principe de la mutagénèse dirigée. Technique utilisée afin de générer des mutations internes.

Après une première étape de dénaturation de 3 min à 94 ° C, trente-cinq cycles de PCR sont réalisés (30 s à 94 ° C, 30 s d'hybridation à une température comprise entre 55 et 65 ° C selon les amorces utilisées et 1 min à 72 ° C). Un cycle final de 7 min à 72 ° C est réalisé.

L'ADN polymérase haute-fidélité Q5 de chez Neb est également utilisée pour générer différentes constructions. Les amorces mutées sont utilisées pour générer les mutations internes par overlap PCR (Figure 13). Une première PCR est réalisée pour induire les mutations puis une seconde est démarrée sans amorces durant 5 cycles pour favoriser l'hybridation entre les brins mutés, puis les amorces sont ajoutées. Dans un mélange de 50 µl constitué de 10 µl de tampon de réaction Q5 (5 X), 2 µl de DNTPs (10µM chacun), 5 µl d'amorce sens (2µM), 5 µl d'amorces inverses (2µM), 1 ng d'ADN et 1 U d'enzyme et 26,5 µl d'eau.

3.9. Electrophorèse :

Les analyses des PCR sont effectuées par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Le tampon utilisé est du tris-acétate-EDTA (TAE) et 4µl de Midori Green sont ajoutés par 100mL de gel afin de visualiser les fragments d'ADN sous UV. La migration s'effectue à 100V et le SmartLadder (Eurogentec) est utilisé comme marqueur de taille.

3.10. Purification de produits de PCR :

La purification est effectuée en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Le gel d'électrophorèse est dissous dans le tampon NT1 (200 µl de tampon pour 100 mg de gel) en étant chauffé à 55°C. Ensuite, le mélange est déposé sur la colonne et centrifugé à 11000 g pendant 1 min. La membrane est lavée deux fois avec 650 µl de tampon NT3 en réalisant à chaque fois une centrifugation (1 min à 11000g). La colonne est séchée lors d'une centrifugation de 2 min. Ensuite, 18 µl d'eau sont déposés sur la colonne et après 1 min à température ambiante, la colonne est centrifugée 1 min à 11000 g pour recueillir l'ADN dans un nouveau tube.

3.11. Digestion de vecteurs et d'inserts :

Le plasmide utilisé pour l'établissement d'une bibliothèque de surexpression de circRNA est le pcDNA3.1 (-).

La digestion est effectuée avec un couple d'enzymes de restriction (NheI / HindIII, XbaI / NotI et HindIII / BamHI). Une double digestion est effectuée sur les sites de restriction situés sur l'insert et dans le vecteur. Un mélange de 50 µl est préparé avec 20 µl d'insert ou de vecteur purifié, 5 µl de tampon CutSmart 10X, 20U de chaque enzyme et de l'eau.

La digestion est effectuée pendant 1h à 37 ° C suivie d'une étape de 20 minutes pour la dénaturation à 80 ° C.

3.12. Ligation :

L'ADN T4 ligase est utilisée (Promega). Le mélange est constitué de 5 µl de tampon T4 DNA Ligase (2X), 1 µl de vecteur, 4U de T4 DNA Ligase et 3 µl d'insert. Le mélange est incubé pendant une nuit à 12 ° C.

3.13. Electroporation :

Les bactéries *Escherichia coli* TG1 sont utilisées afin d'amplifier les plasmides. Ces bactéries sont réalisées au sein du laboratoire. Une préculture est réalisée overnight dans du milieu LB

à 37°C sous agitation. 10 mL de culture sont ajoutés à un litre de LB et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention du DO=0,45. Ensuite, les bactéries sont placées 2h dans la glace, puis, centrifugées 15min à 5000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues dans 250ml d'eau MiliQ glacée. L'étape est répétée quatre fois. Le culot est ensuite resuspendu dans 20mL de glycérol 10% stérile. Le tout est centrifugé une dernière fois. Le culot est resuspendu dans 2mL de glycérol 10% stérile. Les bactéries sont aliquotées par 50µl et congelées à -80°C.

Ces bactéries sont utilisées afin d'être électroporées avec les plasmides créés. 1,5µl de produit de ligation sont ajoutés à 50µl de bactéries puis les bactéries sont électroporées à 2500V pendant 5ms. Dès l'électroporation faite, 150µl de LB à température ambiante sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîtes de gélose LB agar avec de l'ampicilline (100µg/mL) avec les vecteurs pcDNA3.1(-) et avec du X-gal (60µg/mL) et de l'IPTG (40µg/mL) avec le vecteur pGEM-T Easy et puc19. Les bactéries sont incubées à 37°C la nuit.

3.14. Screen bactérien :

Les clones bactériens sont sélectionnés par PCR. Les clones sont repiqués sur boîte de LB agar et ampicilline et mise dans un mix PCR afin de voir si l'insert d'intérêt se trouve. Un mix PCR de 20µl est réalisé (voir point 3.8) et le tout est vérifié par électrophorèse.

3.15. Préparation de l'ADN plasmidique :

Les bactéries sélectionnées contenant le plasmide sont cultivées pendant une nuit dans 200 ml de LB supplémenté avec de l'ampicilline (100µg/mL) à 37 ° C sous agitation. Cette culture est ensuite utilisée avec le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel). La culture est d'abord centrifugée 15 min à 4500 g, puis le surnageant est éliminé, et 8 mL de tampon RES sont utilisés pour remettre en suspension le culot. Ensuite, 8 ml de tampon LYS sont ajoutés et le mélange est incubé 5 min à température ambiante. La réaction est neutralisée avec 8 ml de tampon NEU. Une centrifugation de 10 min à 12000 g est effectuée. Le surnageant est déposé sur la colonne préalablement équilibrée avec 12 mL de tampon EQU. Ensuite, la colonne est lavée avec 5 ml de tampon EQU. Après cela, la colonne est retirée et le tube est lavé avec 8 ml de tampon WASH. Sur un nouveau tube, l'élution est effectuée avec 5 ml de tampon ELU et 3,5 ml d'isopropanol sont ajoutés à la partie d'élution. Le mélange est vortexé et centrifugé 30 min à 15 000 g à 4 ° C. Le surnageant est éliminé et le culot est centrifugé 5 min à 7500 g dans 2 ml d'éthanol à 70%. L'éthanol est jeté, le culot est séché et remis en suspension dans l'eau.

3.16. Transfection :

La transfection est réalisée sur les cellules DF-1. Un million de cellules sontensemencé dans une plaque 6 puits avec 2 ml de milieu complet la veille de la transfection pour atteindre 80 à 90% de cellules confluentes. Pour chaque puits, 4 µg de plasmide sont mélangés avec 400 µl d'Opti-MEM et 10 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont mélangés avec 390 µl d'Opti-MEM puis le tout est incubé 5 min en RT. Les deux mix sont mélangés et ils sont incubés 20 min à température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois avec l'Opti-MEM puis les 800 µl du mélange sont déposés dans le puits. Les cellules sont incubées pendant 4 heures à 41 ° C puis elles sont lavées avec le milieu de culture et 2 ml de milieu complet sont déposés et le tout est incubé 24h avant la récolte.

Tableau 2 : Solutions utilisées pour la réalisation d'un northern blot.

Gel	8,76mL d'eau DEPC ; 1,2mL de MOPS 10X ; 0,18g d'agarose ; 2,04mL de formaldéhyde 37% ; 1µl de Midori Green	
MOPS 10X	41,9g de MOPS (200mM) ; 6,8g de Sodium Acétate (50mM) ; 5mL d'EDTA 10mM ; ajouter 500mL d'eau DEPC, pH=7,0	
MOPS 1X	100mL de MOPS 1X ; 20mL de Formaldéhyde 37% ; ajouter de l'eau DEPC pour obtenir 1L	
SSC 20X	175,3g de Chlorure de Sodium (3M) ; 88,2g de Citrate de Sodium (0,3M); 1L d'eau DEPC, pH=7,0	
SSC 1X	100mL de SSC 20X ; 10mL de SDS 10X ;ajouté de l'eau DEPC pour obtenir 1L	
Maleic acid buffer	11,6g d'acide Maléique (0,1M) ; 8,8g de Chlorure de Sodium (0,15M) ; 1L d'eau DEPC ; pH=7,5	
Washing buffer	Maléic acid buffer ; 0,3% de Tween 20	
Detection buffer	6,05g de TrisHCl (0,1M) ; 2,9g de Chlorure de Sodium (0,1M) ;1L d'eau DEPC ;pH=9,5	
DIG Northern Starter Kit (Roche)	Anti-Digoxigenin-AP antibody	5min à 10000rpm avant utilisation ; dilution 1/10000 dans Blocking Solution
	CDP-Star ready-to-use	/
	DIG Easy Hyb Granules	Rajouter 64mL d'eau DEPC pour reconstituer la solution
	Blocking Solution 10x concentrated	Dilution 10X dans du Maleic Acid buffer
	T7 RNA Polymerase 20 U/µl	/
	DNase I, RNase free 10 U/µl	/
	Labeling Mix 5x concentrated	/
	Transcription Buffer 5x concentrated	/

3.17. Northern blot :

3.17.1. Préparation des sondes

Le kit DIG Northern Starter Kit de Roche a été utilisé afin de synthétiser les sondes. Les sondes ont été synthétisées à partir d'une construction du plasmide puc19 avec l'insert contenant la séquence T7 RNA polymérase et la séquence voulue pour la sonde. Cela afin de réaliser une transcription *in vitro* et d'obtenir une sonde d'ARN.

En premier lieu, une PCR a été réalisée avec la Q5 (voir point 3.9), ensuite une purification a été effectuée (voir point 3.11). L'insert ainsi que le plasmide ont été digérés avec les enzymes de restriction (voir point 3.12) et liguées (voir point 3.13). Ensuite, une transcription *in vitro* a été réalisée avec 1 µg de plasmide linéarisé, 4 µl de Labeling mix 5X, 4 µl de Transcription buffer 5X, 2 µl de RNA polymérase T7 et de l'eau pour atteindre un volume de 20 µl. Le mélange a été incubé 6h à 37°C, puis un traitement DNase a été effectué en ajoutant 2 µl de DNase I et en incubant 15 min à 37°C. Un traitement phénol / chloroforme a ensuite été réalisé.

3.17.2. Migration

En premier lieu, un gel d'agarose est préparé, celui-ci est composé de 8,76 ml d'eau et 0,18 g d'agarose préalablement bouilli ensuite 1µl de Midori Green est ajouté ainsi que 1,2 ml de MOPS 10X et 2,04 ml de formaldéhyde 37%. Le mélange est coulé et un temps d'incubation d'une heure est respecté. Pendant cette incubation, les échantillons sont préparés. 10µg d'ARN sont mélangés à un volume égal de RNA Loading Dye (2X) (BioLabs) et chauffer 10 min à 65°C puis placer immédiatement sur glace. Les échantillons sont ensuite chargés sur gel. La migration s'effectue à 50V durant approximativement 2h30 dans du tampon MOPS 1X.

3.17.3. Transfert passif

Après migration, le gel est rincé deux fois dans de l'eau DEPC et ensuite tremper deux fois 15 min dans du SSC 20X. Deux membranes et six papier Whatman sont trempés dans du SSC 20X. Le montage est ensuite effectué, il est composé de plusieurs couches de papier absorbant, de trois papiers Whatman, d'une membrane, du gel, d'une membrane, de trois papiers Whatman et de plusieurs couches de papiers absorbant. Le tout est mouillé avec du SSC 20X. Un poids est placé par-dessus et le tout est laissé toute la nuit à température ambiante.

3.17.4. Fixation

Après transfert, un papier Whatman est trempé dans du SSC 2X SDS 0,1%. Le papier Whatman est placé dans le four à crosslinker. Les membranes sont placées par-dessus face vers le haut et le four est mis en route durant 33 sec à 0,142 J. Ensuite la membrane est rincée deux fois dans de l'eau DEPC.

3.17.5. Hybridation

La solution d'hybridation est préalablement chauffée à 68°C et la membrane est préhybridée 2h dans la solution à 68°C (15 mL/100 cm²) sous agitation. Les sondes sont préparées en étant bouillies 5 min et ensuite placées sur glace. La sonde (350 ng) est mixée à la solution d'hybridation, le mélange est ajouté à la membrane et le tout est incubé toute la nuit sous-agitation à 68°C.

3.17.6. Détection

La membrane est lavée deux fois 5 min dans du SSC 2X SDS 0,1% à température ambiante sous agitation. Une solution de SSC 0,1X SDS 0,1% est préchauffée à 68°C, ensuite la

membrane est incubée deux fois 15 min dans cette solution à 68°C sous agitation. La membrane est rincée 5 min dans de la solution de lavage, puis incubée 30 min dans 100 ml de solution de blocage, ensuite elle est incubée 30 min dans 50 ml de solution contenant les anticorps. La solution est lavée deux fois 15 min dans de la solution de lavage puis, placée dans un plastique ou 1 ml de solution CDP-star est ajouté. Le tout est incubé 5 min, l'excédent de liquide est éliminé et la membrane est exposée (ImageQuant Las-4000) durant 5 à 25min.

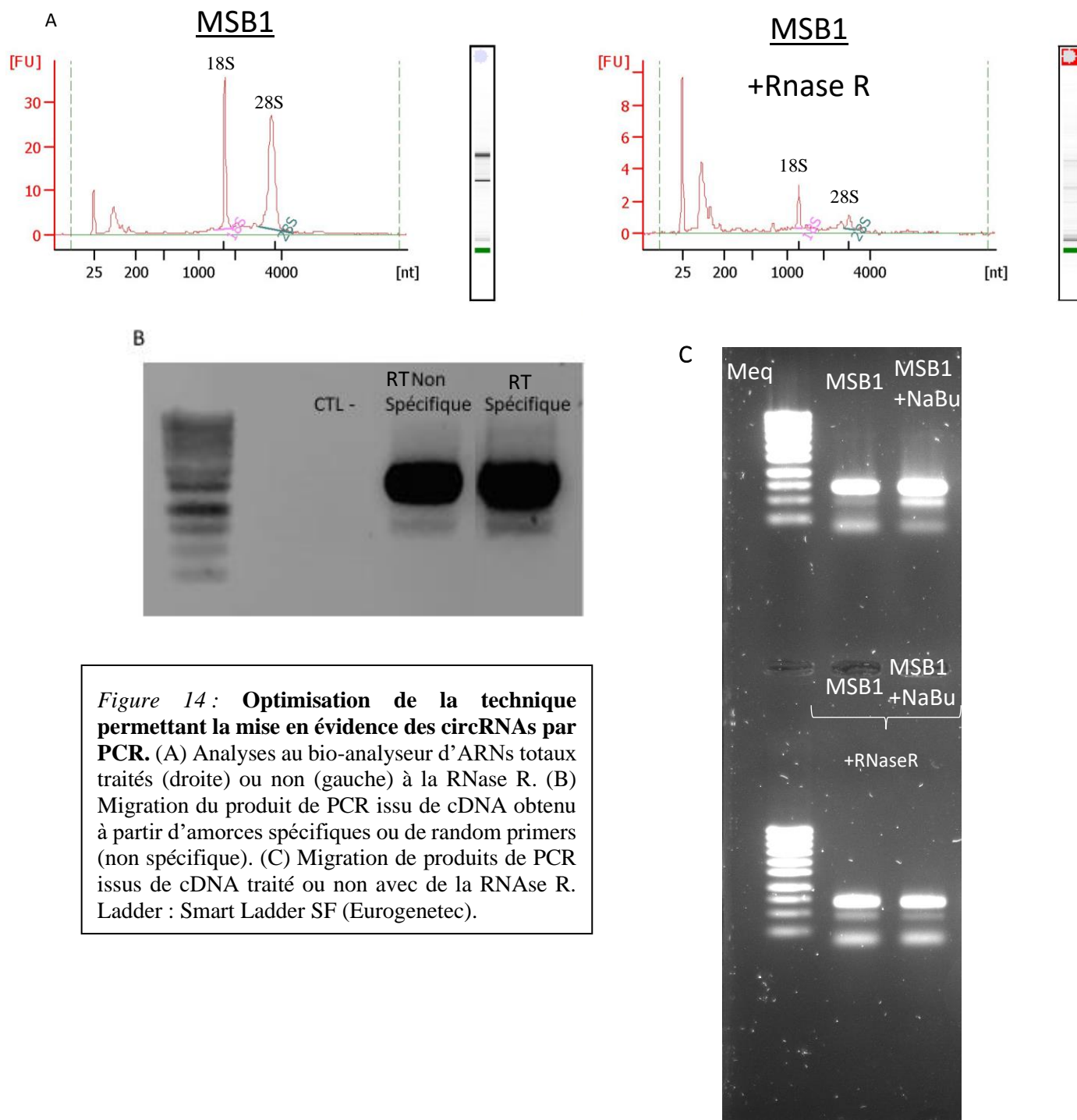


Figure 14: Optimisation de la technique permettant la mise en évidence des circRNAs par PCR. (A) Analyses au bio-analyseur d'ARNs totaux traités (droite) ou non (gauche) à la RNase R. (B) Migration du produit de PCR issu de cDNA obtenu à partir d'amorces spécifiques ou de random primers (non spécifique). (C) Migration de produits de PCR issus de cDNA traité ou non avec de la RNase R. Ladder : Smart Ladder SF (Eurogenetec).

4. Résultats

4.1. Mise au point d'un protocole d'identification des circRNAs

Afin de déterminer quel protocole est le meilleur pour identifier les circRNAs issus du gène *meq*, différentes analyses ont été effectuées. Les circRNAs sont mis en évidence par PCR avec amorces divergentes mais il est nécessaire d'optimiser un maximum la technique décrite dans la littérature.

En premier lieu, l'efficacité du traitement RNase R a été analysée pour vérifier que celui-ci permet bien d'éliminer la plupart des transcrits linéaires et ainsi de favoriser les circRNAs. Afin de déterminer cela, deux échantillons cellulaires provenant de cellules MSB1 ont été traités en parallèle de la récolte jusqu'à l'analyse au bio-analyseur. Les échantillons ont été traités de manière similaire sauf pour le traitement à la RNase R. Un échantillon a reçu de l'enzyme permettant de dégrader l'ARN linéaire tandis que l'autre a reçu un volume similaire en eau. Ensuite, les échantillons ont été analysés au bio-analyseur (Figure 14A). L'analyse démontre que la RNase R agit sur les ARNs linéaire en les dégradant de façon à obtenir une quantité nettement moindre, ce qui est visible par la dégradation des ARNs ribosomaux.

Dans un second temps, une possible optimisation de RT-PCR a été testée. Le but étant de voir s'il est préférable d'utiliser des random primers ou des amorces spécifiques lors de la reverse transcription. Des échantillons d'ARN de cellules MSB1 traités DNase et RNase ont subi une reverse transcription avec l'un ou l'autre type d'amorces. Après PCR sur le gène LAT, le gel (Figure 14B) de migration montre que peu importe le type d'amorces utilisé lors de la reverse transcription, les bandes retrouvées sont identiques et les amorces spécifiques ne permettent pas de mettre en évidence des transcrits qui seraient moins exprimés.

Une troisième analyse a été effectuée afin de vérifier l'utilité du traitement à la RNase R. Une PCR a été réalisée sur des échantillons MSB1 et MSB1 traité au NaBu afin de mettre en évidence les transcrits circulaires issus du gène *meq*. Le gel (figure 14C) montre que les résultats des échantillons non traités sont identiques que les échantillons traités à la RNase R pour ce qui est des bandes obtenues. Il y a une légère différence au niveau des abondances de certains transcrits. Cependant, pour ce projet, cette différence d'abondance n'est pas un frein à l'analyse.

Cette analyse permet d'obtenir la mise au point d'un protocole optimal pour la mise en évidence des circRNAs. En effet, un traitement avec la RNase R permet de dégrader la plupart des ARNs ribosomaux, permettant dès lors de favoriser la mise en évidence des circRNAs au sein des échantillons. Ensuite, l'utilisation de random primers permet de faciliter la technique en produisant un cDNA utilisable lors de toutes les PCR et en même temps d'avoir une bonne qualité de résultats. Pour terminer, dans notre cas, la RNase R n'est pas indispensable pour optimiser les résultats et afin de pouvoir comparer les ARNs linéaires et les circRNAs, elle ne sera pas utilisée.

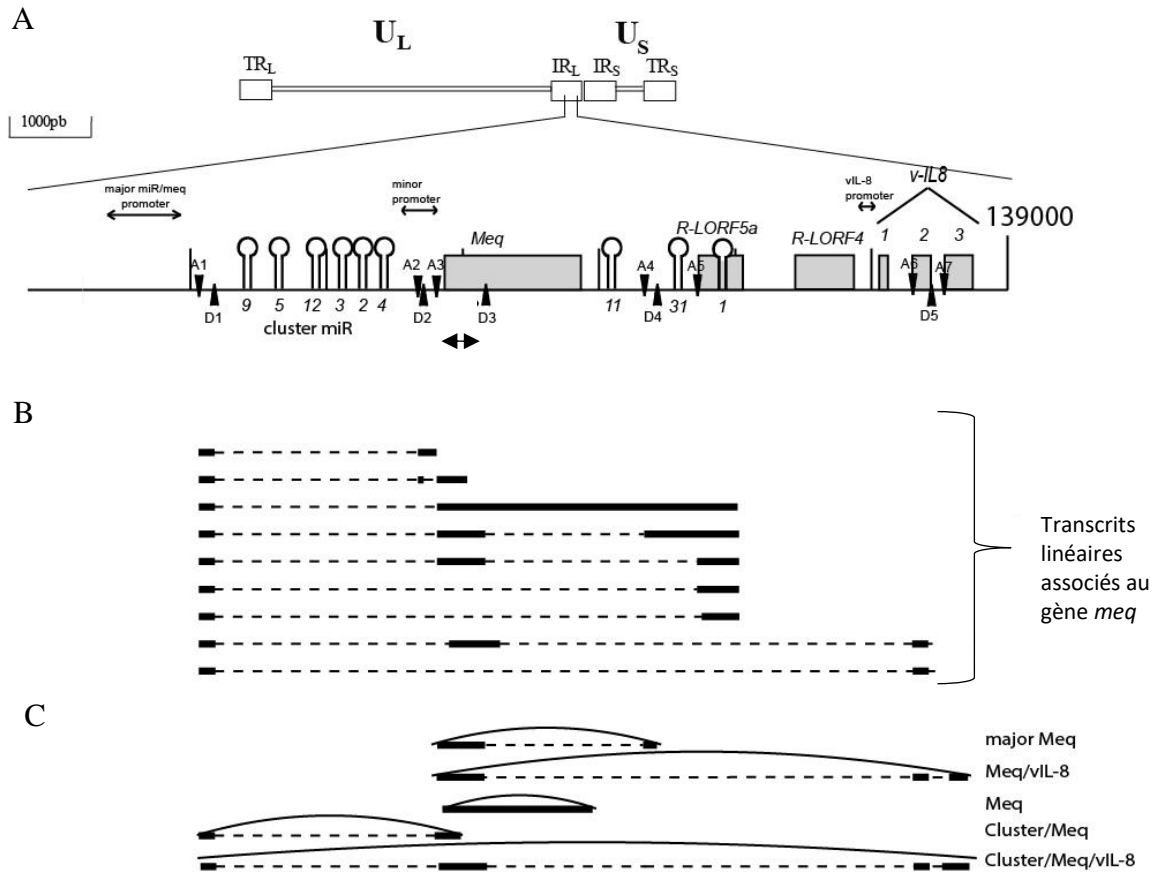


Figure 15 : Représentation des différents transcrits issus du gène *meq*. (A) Représentation schématique d'une partie de l'IRL du virus GaHV-2 et localisation du gène *meq*. Les amorces divergentes utilisées sont représentées par des pointes de flèches. ORF : rectangles gris ; miRNAs : tige/boucle ; A : site accepteur ; D : site donneur. (B) Transcrits linéaires issus du gène *meq* précédemment découvert. Rectangles noirs : exons ; lignes pointillées : introns. (C) Transcrits circulaires découverts avec les primers divergents localisés dans l'exon A3/D3.

4.2. Identification de circRNAs produits par le gène *meq*

L'analyse ultérieure de résultats obtenus par différents membres du laboratoire ainsi que l'analyse de la littérature permettent de savoir qu'il existe différents transcrits produits par le gène *meq* (figure 15B). Cette région apparaît comme une bonne région pour la recherche de circRNAs car elle subit un fort épissage aboutissant à différents transcrits linéaires. Afin de rechercher les circRNAs dans cette région, des PCR ont été réalisées. Ces PCR ont été réalisées à partir d'amorces divergentes localisées sur l'exon du gène *meq* (A3/D3) sur des échantillons provenant des cellules MSB1 (Figure 15A). Les résultats obtenus par PCR ont subits une migration et les différents transcrits obtenus ont été séquencés. Cinq transcrits correspondants à des circRNAs ont été découverts (Figure 15C). Ces transcrits sont tous constitués d'une partie de l'exon *meq* (A3/D3) et diffèrent par l'utilisation de bornes d'épissage alternatives. Un des transcrits étant très fortement exprimé en comparaison des quatre autres, il sera appelé major Meq circRNA (Figure 15C). Ce circRNA est constitué de 431 pb et comprend la région de l'exon *meq* (A3/D3) et l'exon issu de l'épissage A4/D4.

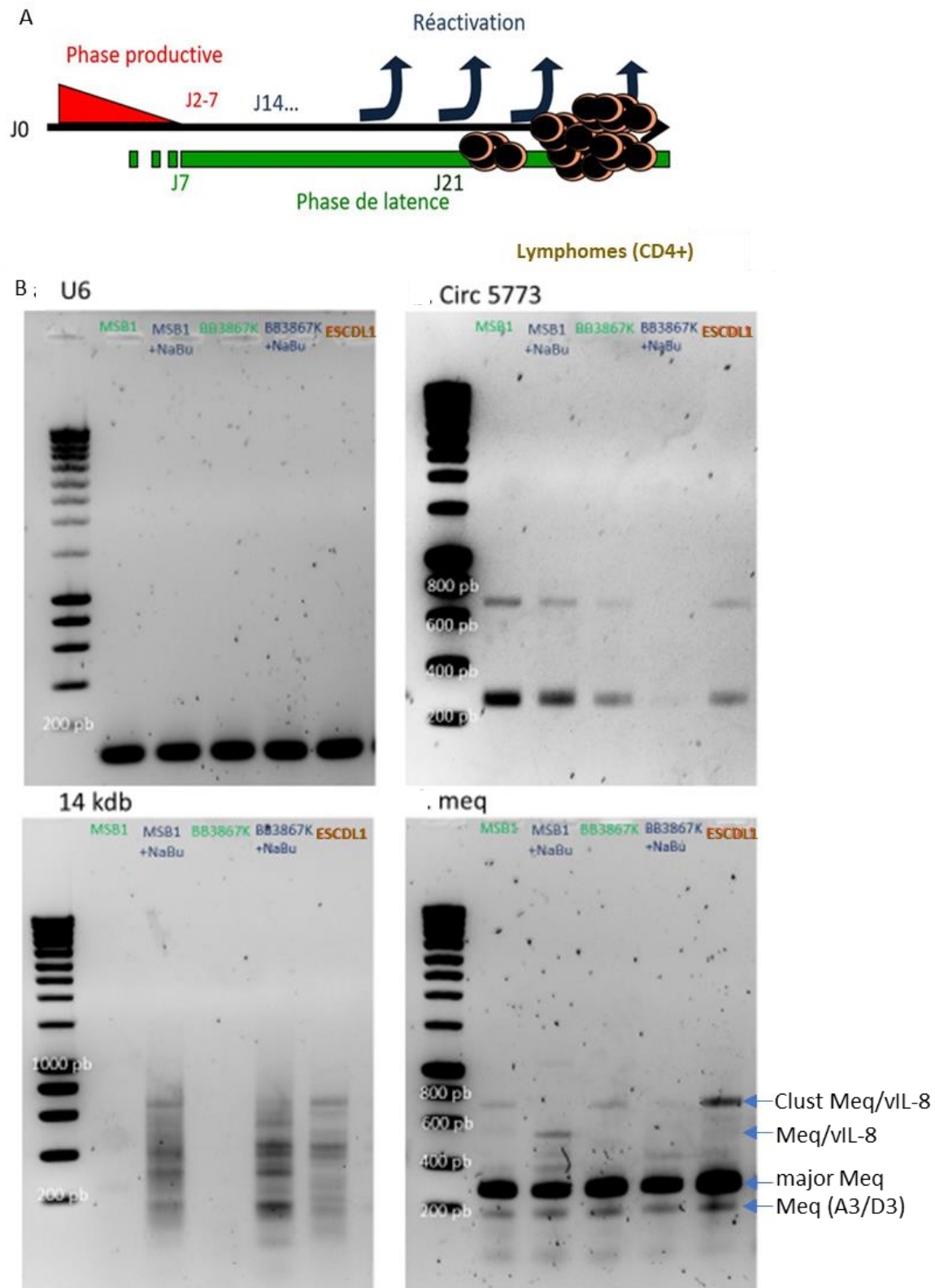


Figure 16 : Profil d'expression des différents ARNs linéaires et circulaires durant les différents stades du cycle viral. (A) Phases du cycle viral (B) Migration des différents amplicons de U6, du circRNA 5773, de 14 kdb et de *meq*. (Lignées cellulaires : rouge = phase productive ; vert = phase de latence ; bleu = phase de réactivation ; brun = phase lytique. Ladder = Smart Ladder SL (Eurogentec).

4.3. Expression du major Meq circRNA durant le cycle viral

Afin de confirmer les résultats précédemment obtenus quant à la présence de circRNAs issus du gène *meq* et afin de voir le profil du major Meq circRNA durant le cycle viral, des PCR ont été réalisées. Ces PCR ont été effectuées sur différentes lignées cellulaires correspondant aux différents stades du cycle viral. Les cellules MSB1 et BB3867K sont des cellules infectées par le virus en phase de latence, le virus est réactivé par l'ajout de NaBu. Les ESCDL1 représentent des cellules infectées par le virus en phase lytique. Afin d'estimer la quantité du major Meq circRNA, différents transcrits linéaires et circulaires ont été analysés.

En premier lieu, une PCR avec des amorces permettant de détecter U6, un gène de ménage linéaire, a été réalisée. Ce gène est continuellement exprimé avec une quantité identique durant tout le cycle viral et dans tous les types cellulaires (Figure 16B).

Ensuite, un deuxième couple d'amorces a été utilisé, celui-ci est divergent et a été fait pour détecter le circRNA 5773 du poulet. Ce circRNA est toujours présent avec la même taille dans les différentes lignées cellulaires mais sa quantité varie en fonction de la lignée cellulaire et du cycle viral (Figure 16B). Ce circRNA a été décrit par Zhang et al (Y. Zhang et al. 2019) sous une seule forme mais une forme d'environ 700 pb a été découverte lors de l'analyse. Ces deux circRNAs confirment la présence de circRNAs dans les différentes lignées cellulaires.

Des amorces divergentes ont été utilisées afin de détecter les circRNAs issus de GaHV-2 au niveau des régions répétées. En premier lieu, une paire d'amorces divergentes a été utilisée et permet de mettre en évidence les circRNAs au niveau de la région 14 kdb. Des circRNAs ont précédemment été découverts dans cette région. Comme la plupart des circRNAs, précédemment découverts, codés par GaHV-2, les circRNAs issus de la région 14 kdb sont exprimés de manière différentielle en fonction du cycle viral (Figure 16B). Il n'y a pas de circRNAs exprimé durant la latence pour ce couple d'amorces, ceux-ci apparaissent lors de la phase de réactivation. Lors de la phase lytique, des circRNAs sont produits mais ils semblent différer de ceux exprimés lors de la phase de réactivation.

Le dernière PCR a été faite avec les même amorces divergentes que celles utilisées pour l'analyse des différents transcrits circulaires du gène *meq*. Cette paire d'amorces permet de montrer la forte expression du major Meq circRNA et son expression tout au long du cycle viral et dans tous les types cellulaires (Figure 16B). Cela permet aussi de voir les différents circRNAs issus du gène *meq*. Il est constaté qu'il existe un deuxième circRNA de petite taille également exprimé tout au long du cycle infectieux, cela semble correspondre à la recircularisation de l'exon (A3/D3). Un circRNA, le clust Meq/vIL-8, est quant à lui exprimé uniquement en phase de latence et lytique de façon différentielle.

Les différents contrôles permettent de confirmer les méthodes, la préparation des échantillons et la présence d'ARN circulaires. Les résultats du gène 14 kdb montrent que l'expression des circRNAs varient en fonction du cycle infectieux et du type cellulaire. Ils montrent également un profil d'expression spécifique en fonction de la phase du cycle viral comme chez les autres herpesvirus. Au niveau du gène *meq*, les résultats montrent qu'il y a une différence d'expression au cours du cycle viral mais que deux circRNAs reste exprimé et présent lors de tout le cycle infectieux et dans tous les types cellulaires. Un des circRNAs est majoritairement exprimé, ce circRNA a une taille de 279 pb sur la migration du gel et correspond au major Meq circRNA découvert précédemment.

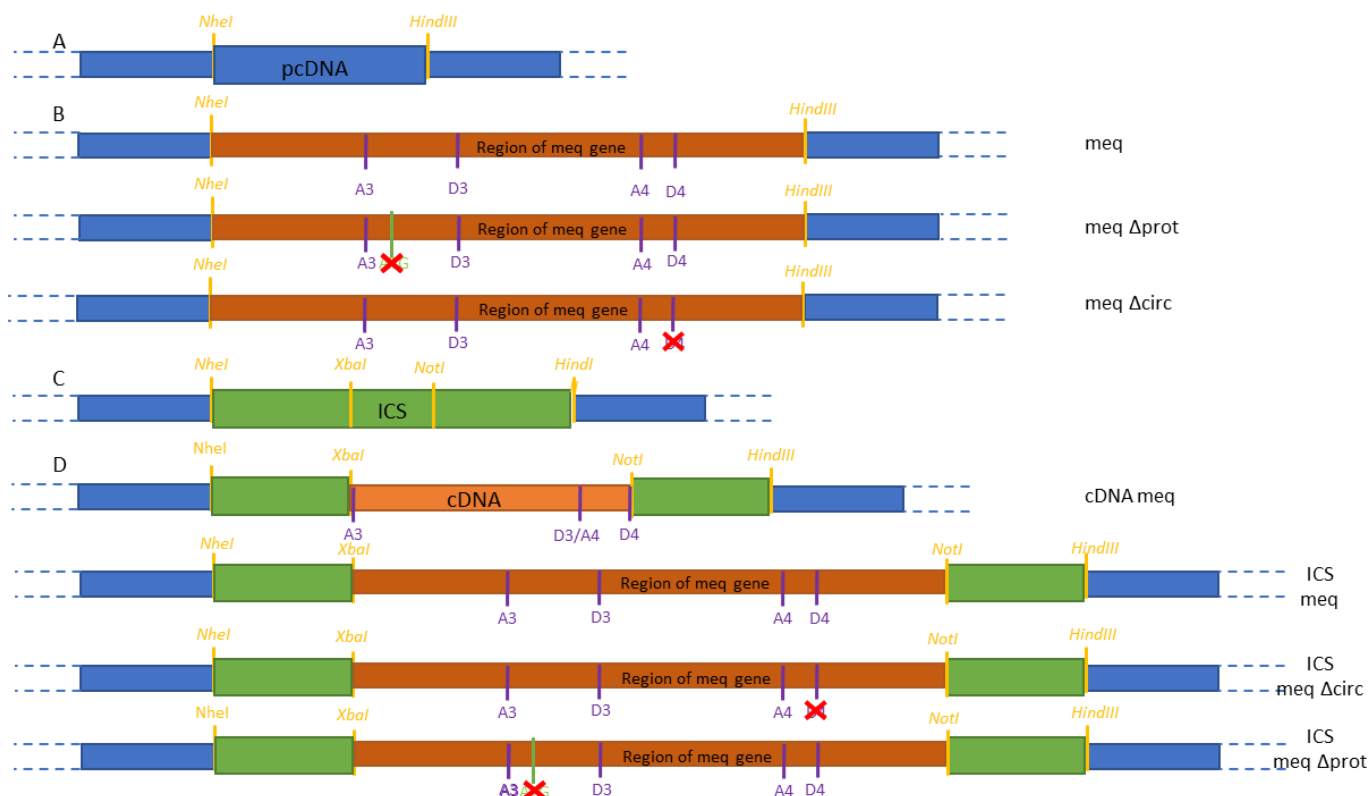


Figure 17 : Schéma représentatif des constructions plasmidiques (A) PcDNA3.1(-) avec les deux sites de restriction utilisés (NheI et HindIII). Constructions (B) du gène *meq*, avec l'ATG muté, avec la borne D4 mutée, (C) de la séquence ICS avec les sites de restriction utilisés (XbaI et NotI) et (D) des ICS avec le cDNA du major Meq circRNA, avec le gène *meq*, avec le gène *meq* muté au niveau de la borne D4 et avec le gène *meq* avec l'ATG muté.

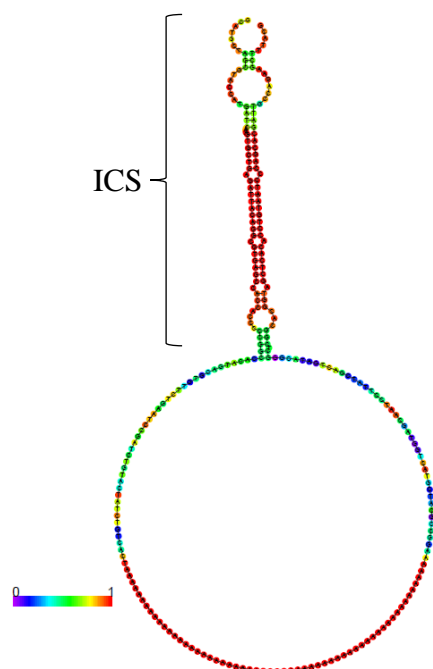


Figure 18 : Complémentarité des ICS permettant de favoriser la génération de circRNAs (RNA fold).

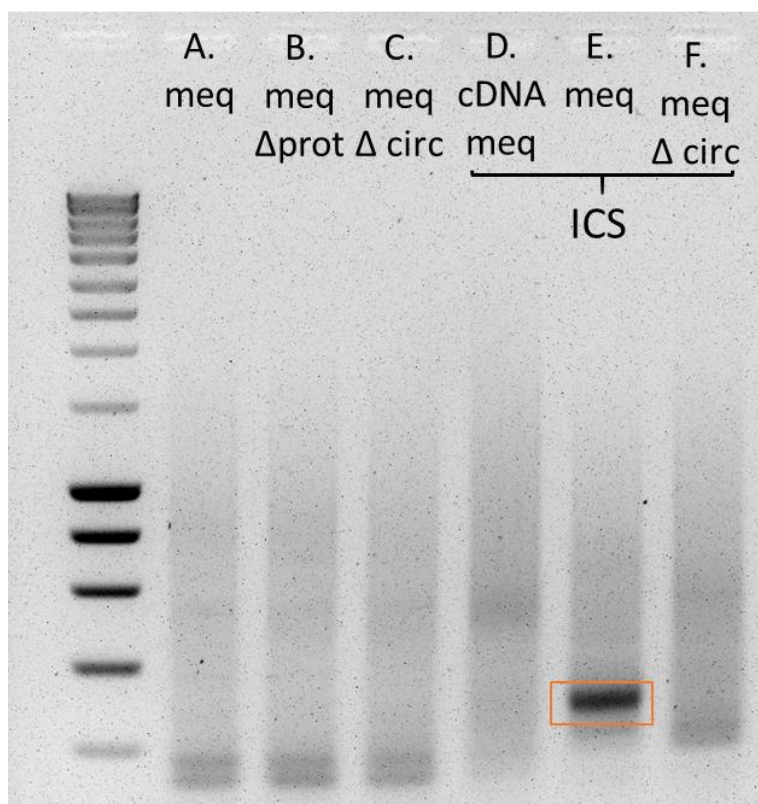


Figure 19 : Expression du major Meq circRNA induit par le système artificiel de surexpression. Résultat des analyses de transfections avec les constructions (A) du gène *meq*, (B) avec l'ATG muté, (C) avec la borne D4 mutée. Constructions avec les ICS et (C) le cDNA du major Meq circRNA, (D) le gène *meq*, (F) avec la borne D4 mutée. Ladder : Smart Ladder SL (Eurogentec)

4.4. Génération d'un système artificiel induisant la production de circRNAs

4.4.1. Production artificielle du major Meq circRNA

Afin de pouvoir découvrir le rôle du major Meq circRNA qui est un circRNA très exprimé durant tout le cycle viral, un outil de surexpression a été imaginé. Afin de produire le major Meq circRNA, différentes constructions plasmidiques (Figure 17A) ont été créées afin de trouver la plus apte à produire ce circRNA.

Une première série de construction a été réalisée afin de déterminer si la région entourant le gène *meq* (Figure 17B) pouvait à elle seule produire le major Meq circRNA. Cette région comprend les exons du gène *meq* ainsi que les introns situés autour. Trois constructions différentes ont été réalisées : (i) le plasmide avec la région du gène *meq*, (ii) le plasmide avec la région du gène *meq* mais avec une mutation au niveau de l'ATG de la protéine afin d'empêcher la production de la protéine mais de conserver la production du circRNA, (iii) le plasmide avec la région du gène *meq* mais avec une mutation au niveau de la borne donneuse D4 afin d'empêcher la formation de circRNA tout en conservant la production de la protéine.

Une deuxième série de construction a été faite avec l'introduction d'ICS de chaque côté du gène *meq* (Figure 17C). La séquence ICS est une séquence provenant de l'article de Liang et Wilusz (Liang et Wilusz 2014), où il a été découvert que seulement 30 nucléotides sont nécessaires pour induire une circularisation de séquence. Cette séquence est donc composée de 30 nucléotides complémentaires de chaque côté du gène (Figure 18). Trois plasmides ont été créés (figure 17C) : (i) un plasmide avec les ICS et la séquence du major Meq circRNA, (ii) un plasmide avec les ICS et la région du gène *meq*, (iii) un plasmide avec les ICS et la région du gène *meq* mutée au niveau de la borne D4 de la back jonction.

Ces différentes séquences ont été faites dans le pcDNA3.1(-) via mutagénèse dirigée et les constructions ont été séquencées afin de confirmer la séquence produite. Une fois les séquences vérifiées, les différentes constructions ont été transfectées dans des cellules DF-1, qui ne sont pas infectées par le virus GaHV-2. Cette transfection permet de voir si les différentes constructions ont la capacité de produire le major Meq circRNA. Afin de vérifier la production du major Meq circRNA, une PCR a été réalisée sur l'ADNc des cellules après transfection. Cette PCR permet de voir si le circRNA est produit et quelle construction servira d'outils artificiel pour générer le major Meq circRNA.

La PCR a été réalisée avec les amorces divergentes précédemment utilisées pour mettre en évidence le major Meq circRNA, situées au niveau de l'exon A3/D3. Le gel de migration (Figure 19) montre qu'il n'y a qu'une seule bande au niveau de la taille attendue, c'est-à-dire 279 pb ce qui correspond au major Meq circRNA. La construction permettant d'obtenir cette bande est le plasmide avec les ICS et le gène *meq* non muté. Cette bande a ensuite été découpée afin d'être envoyée au séquençage afin de vérifier la séquence du circRNA produit. Après vérification, il s'agit effectivement du major Meq circRNA. Il est également visible sur les résultats que le fait de muter la borne D4 empêche la formation du circRNA, ce qui fait de cette borne, une borne essentielle à la formation du major Meq circRNA.

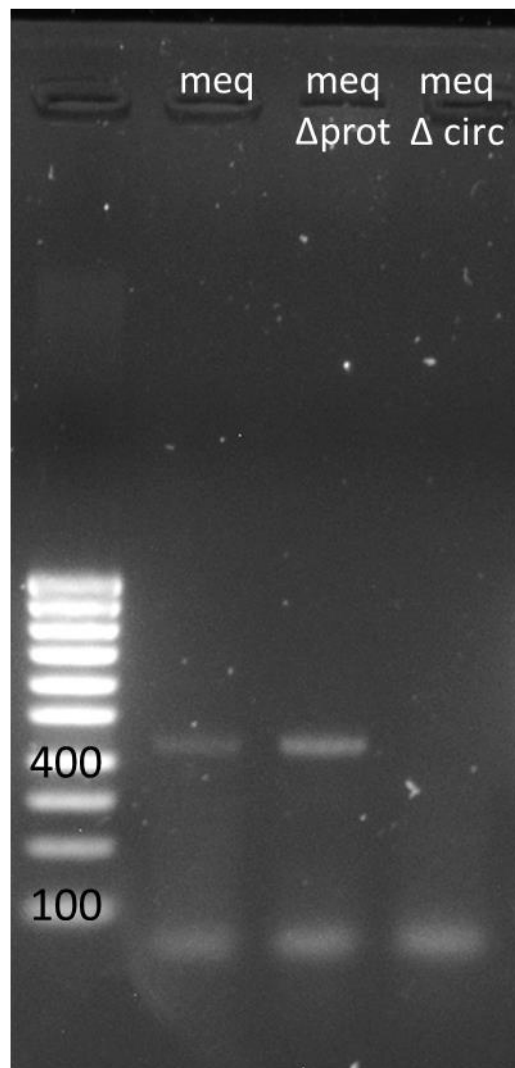


Figure 20 : Expression de circRNAs induits par le système de surexpression. Résultat des transfections avec les constructions avec ICS du gène *meq*, avec l'ATG muté, avec la borne D4 mutée. Ladder : Smart Ladder SF (Eurogentec)

A la suite de ces résultats, un duplicat a été réalisé afin de vérifier les résultats obtenus précédemment et d'inclure une nouvelle construction. Les constructions avec les ICS uniquement ont été testées à nouveau. Une nouvelle construction a été réalisée cette fois-ci avec une mutation au niveau de l'ATG afin d'empêcher la production de la protéine et d'obtenir un modèle où le circRNA sera produit mais où la protéine sera inhibée.

Les constructions ont été transfectées comme précédemment. Une PCR a été réalisée avec des amorces divergentes situées sur le petit exon de Meq, l'exon A4/D4. Le résultat (Figure 20) montre qu'il y a une bande à la taille attendue pour les conditions avec le gène *meq* et avec celui-ci mais avec une mutation au niveau de l'ATG. Comme précédemment, lorsque la back junction est mutée, le circRNA n'est plus exprimé.

Ces résultats montrent que l'outil de surexpression est efficace et que les résultats sont répétables.



Figure 21 : Construction du gène *Lat*. Construction avec les ICS et les exons 8 à 12 du gène *lat*.

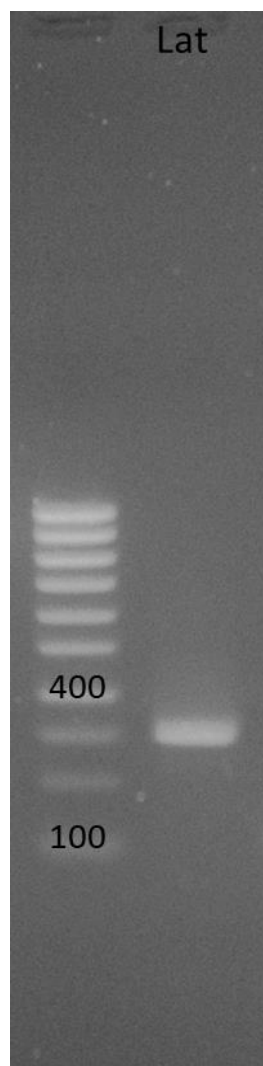


Figure 22 : Expression de circRNAs issus du gène *lat* induits par le système artificiel. Résultat de la transfection avec la construction avec ICS le gène *lat*. Ladder : Smart Ladder SF (Eurogentec)

4.4.2. Vérification du système artificiel

Afin de vérifier que d'autres locus peuvent être insérés et prouvés que notre outil est universel, une vérification a été effectuée. Pour cela, une nouvelle transfection a été faite.

Une construction a été réalisée afin de voir si notre outil permet de générer d'autres circRNAs en fonction du gène constituant la construction. Le gène choisit est le gène *lat* où des circRNAs ont été découverts précédemment (résultats non montrés). Ce gène est constitué de 15 exons et un circRNA a été découvert constituer des exons 8 à 12, celui-ci semble plus exprimé que les autres. Il a donc été décidé de faire la construction en insérant la partie du gène constituée de l'exon 8 à 12 et en gardant les ICS autour du gène (Figure 21).

Après transfection dans des cellules DF-1, une PCR a été effectuée avec des amorces divergentes situées sur l'exon 9 du gène *lat*. Le résultat du gel (Figure 22) montre une bande à une taille de 300 pb. Après séquençage, il s'agit bien d'un circRNA issu du gène *lat* mais pas celui attendu. Ce circRNA est plus court et n'est pas constitué des exons 8 à 12 comme obtenus naturellement mais uniquement des exons 9 et 10.

Le résultat montre que différents gènes peuvent être introduits et qu'il est possible de générer d'autres circRNAs. Cependant, il n'est pas possible de prédire le circRNA produit. En effet, le modèle est efficace mais il ne représente pas forcément ce qu'il se passe de façon naturelle. Il est donc possible d'exprimer des circRNAs avec une forme alternative à ceux retrouvés lors d'une véritable infection.

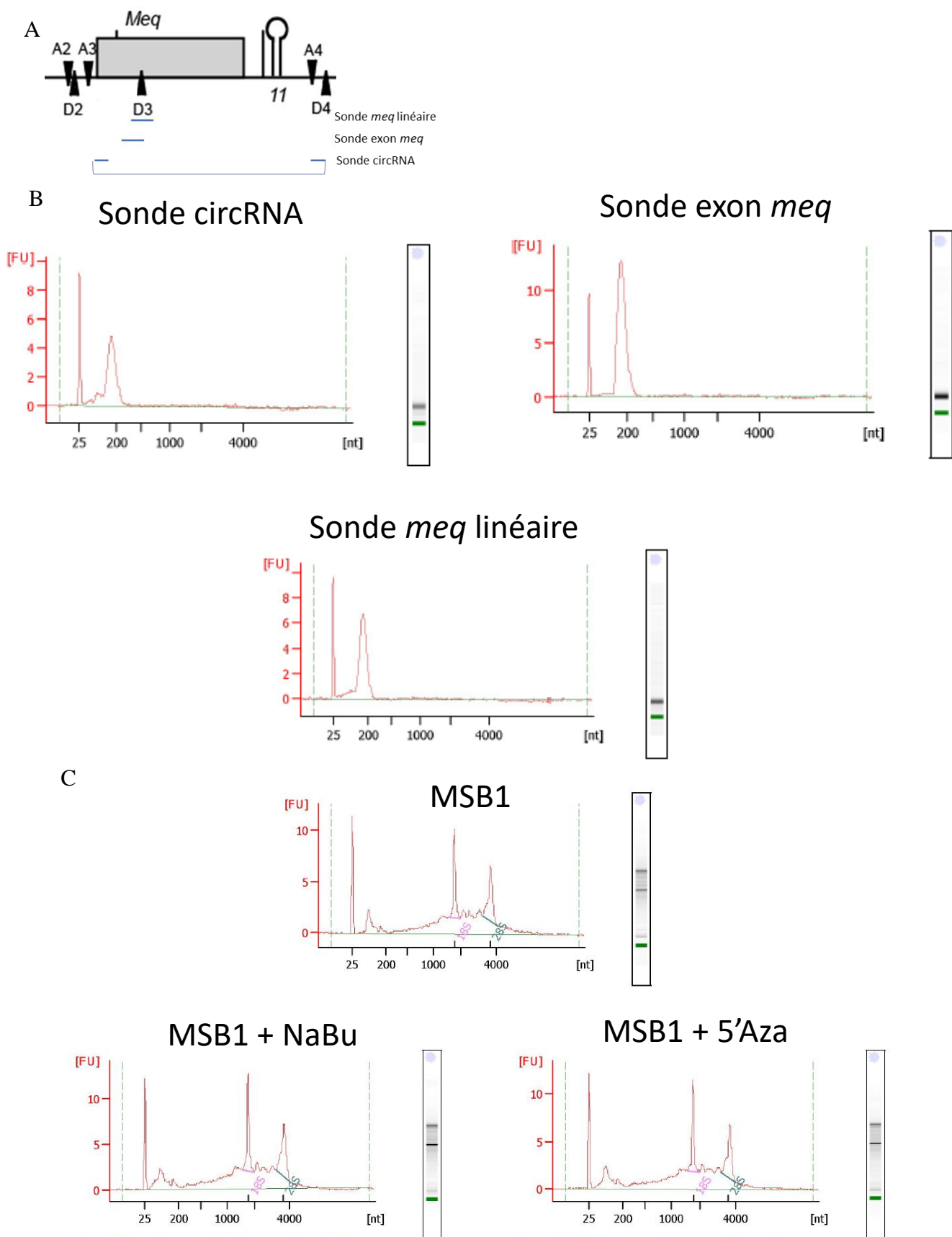


Figure 23 : Bio-analyse des sondes et des échantillons d'ARNs. (A) Représentation schématique de l'emplacement des sondes sur le gène *meq*. (B) Bio-analyses des sondes d'ARN marquées pour la réalisation d'un northern blot. (C) Bio-analyses des ARNs issus de la lignée cellulaire MSB1.

4.5. Etude de l'abondance des différents transcrits issus du gène *meq*

Afin de déterminer l'abondance du major Meq circRNA en comparaison avec les différents transcrits linéaire, un northern blot a été réalisé. Ce northern blot a été réalisé sur une lignée cellulaire, les MSB1, représentant le virus en latence. Ces MSB1 ont également été traitées avec du NaBu ou du 5'Aza afin de représenter le virus en phase de réactivation.

Différentes sondes ont été synthétisées afin de mettre en évidence le transcrit *meq*, le circRNA ou les deux formes. Trois sondes ont été réalisées par transcription *in vitro* (Figure 23A) : (i) une sonde étant spécifique de l'exon *meq* A3/D3 permettant la mise en évidence des deux formes de transcrits ; (ii) une sonde spécifique du transcrits *meq* linéaire ciblant la région de l'exon A3/D3 et de l'intron suivant ; (iii) une sonde spécifique des circRNAs ciblant la back jonction. Ces trois sondes ont été créées avec un nombre identique d'adénosines afin que lors de la transcription *in vitro*, le nombre d'uraciles marqués à la digoxigénine soit identiques. Ces sondes sont constituées d'une moyenne de 100 nucléotides afin d'obtenir la meilleure spécificité sans trop réduire le nombre de transcrits potentiellement détectable.

Les sondes ont été synthétisées par transcription *in vitro* et ensuite passées au bio analyseur afin de vérifier leur taille et leur pureté. Les résultats (Figure 23B) montrent que chaque échantillon possède un seul et unique pic représentant la sonde à la taille attendue ce qui signifie que l'échantillon est pur et contient bien la sonde nécessaire pour la mise en évidence des différents transcrits du gène *meq*.

Les échantillons utilisés ont eux aussi été analysés au bio analyseur afin de vérifier la qualité de l'ARN (Figure 23C). L'utilisation de la RNase R est inutile puisqu'il s'agit d'une comparaison entre les circRNAs et les transcrits linéaires. L'analyse montre que l'ARN est conservé avec deux pics au niveau des ARNs ribosomiaux. Ces ARNs ont ensuite été utilisés pour la réalisation du northern blot.

En premier lieu, le gel a été observé sous UV afin de vérifier la migration et la présence de l'ARN dans les puits. Cette étape permet de s'assurer que l'ARN a bien été conservé et préparé. Le gel (Figure 24A) montre que l'ARN a bien migré et il est même possible de voir les bandes correspondant aux ARNs ribosomiaux. Les profils sont identiques pour les trois types cellulaires.

Le northern blot a été réalisé sur trois membranes afin de pouvoir analyser les échantillons avec les trois sondes réalisées. Tout le processus a été réalisé en parallèle afin d'avoir des résultats comparables. Les résultats (Figure 24B) montrent différentes bandes au niveau des différentes membranes uniquement pour les échantillons MSB1.

La première membrane montre les résultats obtenus avec la sonde spécifique des transcrits linéaires. Quatre bandes distinctes sont observables avec une abondance comparable. La seconde membrane montre les transcrits révélés par la sonde spécifique de l'exon A3/D3, mettant également en évidence quatre bandes distinctes. La troisième membrane avec la sonde spécifique de la back jonction D4/A3, montre trois bandes moins exprimées.

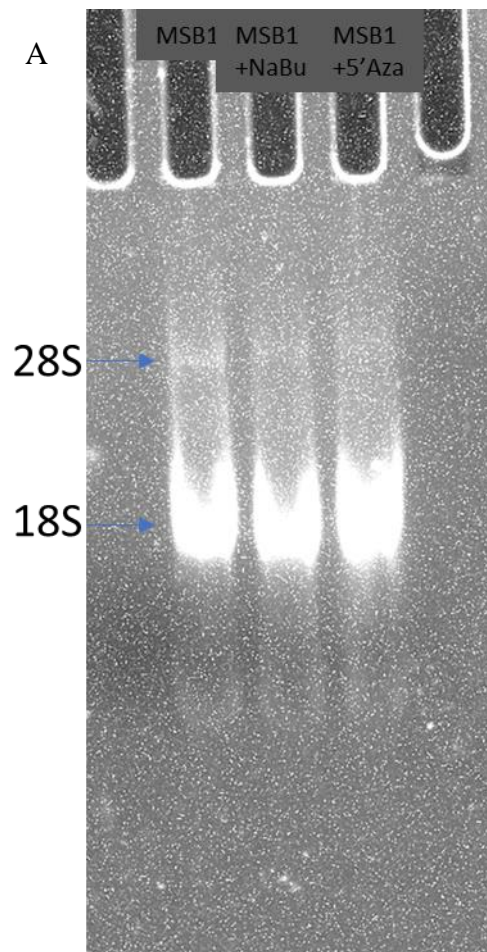
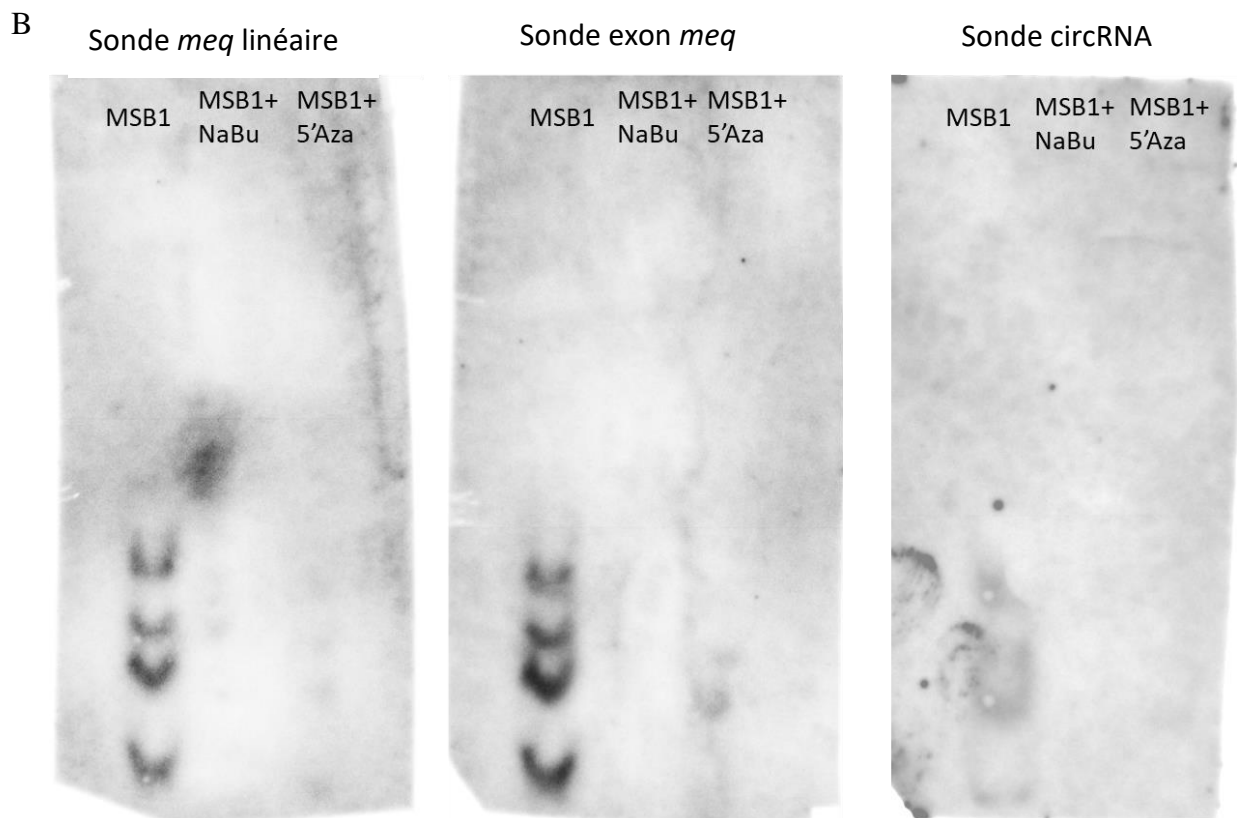


Figure 24 : Profil d'expression des transcrits du gène *meq*. (A) Migration sur gel d'agarose des différents ARNs MSB1. (B) Membranes de northern blot après révélation par chimiluminescence, spécifique des transcrits *meq* linéaire, de l'exon A3/D3 et de la back jonction D4/A3.



Les membranes pour les transits linéaires et exoniques ont le même profil ce qui signifie que les transcrits mis en évidence possède la région exonique A3/D3 et également l'intron suivant. Ces transcrits représentent possiblement le transcrit codant pour la protéine Meq ainsi que d'autres transcrits issu du gène *meq*. Mais il n'est pas possible de déterminer de quoi il s'agit. Pour ce qui est de la dernière membrane, le profil est très similaire aux deux autres membranes mais avec une abondance moindre. Ces résultats sont très encourageants pour la suite.

miRNA : mdv1-miR-M1-5p

circRNA 5' G AU AAAG A 3'
G GUA GAAUAAGCG
C CGU CUUGUUCGU
miRNA 3' A GG GUCA 5'

miRNA : mdv1-miR-M2-5p

circRNA 5' G GAA G C G 3'
GGA G CGGGCA GGUACAG
CCU U GCCCGU UUAUGUU
miRNA 3' G GA G C G 5'

miRNA : mdv1-miR-M6-5p

circRNA 5' A AA A 3'
GGAAUAUUA GAUAACAGG
UCUUGUGAU UUGUUGUCU
miRNA 3' C GCC 5'

miRNA : mdv1-miR-M9-5p

circRNA 5' A AGAAG AAA A 3'
AAC CUGG GGAGGAGAAAA
UUG GGCC CUUCCUCUUUU
miRNA 3' A CCC 5'

miRNA : mdv1-miR-M11-5p

circRNA 5' C UCC CCUAUC G 3'
CU CUG ACGG UGAGGAGGA
GA GAU UGCC AUUCCUUUU
miRNA 3' A UUC G 5'

Figure 25 : Complémentarité entre le major Meq circRNA et les miRNAs encodés par le virus. Prédiction de complémentarité de séquences. Bleu : complémentarité, Rouge : non complémentarité, Souligné : Seed Sequence.

4.6. Prédiction bio-informatique

Une analyse bio-informatique a été réalisée pour découvrir le rôle potentiel de ce circRNA. Cette analyse bio-informatique a été réalisée avec le logiciel ARN hybride 2.2 pour déterminer s'il existe des complémentarités entre le major Meq circRNA et certains miRNAs.

Le rôle d'éponge à miRNAs des circRNAs est bien connu et le circRNA d'intérêt peut potentiellement avoir ce rôle au vu de sa composition uniquement exonique. L'analyse a été réalisée contre les miRNAs du poulet, l'hôte de GaHV-2, et les miRNAs du virus.

Au niveau des miRNAs du poulet, aucune complémentarité forte n'a été retrouvée. Pour ce qui est du virus, cinq complémentarités comprenant l'intégralité de la seed sequence ont été trouvées entre les miRNAs du virus et le major Meq circRNA (Figure 25). Ces cinq miRNAs sont localisés dans l'IRL (figure 15A ; miR-M1, M2, M9 et M11) et l'IRS (miR-M6). Les quatre miRNAs localisés autour du gène *meq* sont impliqués dans la tumorigenèse et le miR-M6-5p est impliqué dans l'infection latente (Zhou et Zheng 2019). Ces miRNAs ne semblent pas impliqués dans la réplication virale car la suppression du cluster précédent le gène *meq* ne l'affecte pas. Le miR-M2-5p et le miR-M9-5p sont impliqués dans l'augmentation de la tumorigenèse. Leur suppression n'affecte pas la réplication du virus mais diminue la progression tumorale (M. Teng et al. 2015). La suppression du miR-M1-5p et du miR-M11-5p augmente la pathogénicité et la tumorigénicité, ces miRNAs auraient un rôle de suppresseur de tumeur. Le miR-M11-5p cible le gène *meq* et régule à la baisse son expression (Man Teng et al. 2017).

Le rôle exact du major Meq circRNA sur ces miRNAs n'est pas connu mais ces complémentarités sont une avancée quant au rôle potentiel de ce circRNA.

5. Discussion et perspectives

GaHV-2, un herpesvirus animal, est désormais un modèle d'étude des circRNAs. Nos résultats confirment la présence de circRNAs durant l'infection virale. Les circRNAs découverts sont issus d'un phénomène de backsplicing et ils existent différents circRNAs issus d'un même gène. Cette étude s'est principalement focalisée sur une région, la région du gène *meq*, l'oncogène majeur du virus. Cette région fut choisie pour le taux important d'épissage qui a lieu et les différents transcrits connus.

La première étape de cette recherche fut de mettre au point un protocole idéal pour obtenir les meilleurs résultats possibles et de permettre la découverte d'un maximum de circRNAs. Comme décrit dans la littérature, un traitement à la RNase R permet de dégrader une grande partie des ARNs linéaires. Une rétrotranscription spécifique n'est pas nécessaire dans notre cas et un traitement à la RNase R non plus.

Lors de la recherche des circRNAs, cinq différents transcrits circulaires, issus de l'épissage, furent découverts. Parmi ces cinq transcrits, un est apparu comme beaucoup plus exprimé que les autres dans la lignée cellulaire testée. Ensuite, différentes lignées cellulaires ont été testées et cela a permis de confirmer l'expression continue de ce major Meq circRNA durant toutes les phases de l'infection virale. De plus, il reste plus exprimé que les autres circRNAs découverts au niveau de cette région.

Après ces découvertes, une première question s'est posée concernant le rôle de ce major Meq circRNA. Afin de pouvoir étudier ce rôle, une construction artificielle a été établie afin de pouvoir exprimer notre circRNA ou d'autres de façon artificielle. Différentes constructions furent élaborées et après analyse, une seule permettait d'exprimer le major Meq circRNA et donc de servir d'outil pour l'étude de ce circRNA. Cette construction est composée d'ICS qui entourent la région du gène *meq*. Ces ICS sont essentielles à la circularisation car elles permettent le rapprochement des extrémités de l'insert et donc des bornes d'épissage nécessaires à la back jonction. Une fois cette construction validée, une seconde validation a été effectuée. Cette validation visait à confirmer le caractère universel de notre outil. Pour cela, un autre gène, le *lat*, a été inséré entre les ICS. Différents circRNAs avaient également été découverts au niveau de ce gène et lors de l'analyse, un circRNA a été produit. Cependant il ne s'agit pas de celui espéré, ce qui montre que notre construction est universelle mais qu'il est impossible de prédire le circRNA produit. Il est donc nécessaire de tester chaque construction afin de déterminer le circRNA produit.

Différentes constructions ont été élaborées afin de permettre une étude future. La construction avec l'ATG muté permet d'avoir un modèle d'étude du rôle du circRNA sans avoir la production de la protéine. La construction avec la mutation au niveau de la back jonction permet d'étudier le rôle de la protéine sans produire le circRNA. Au départ, la construction avec le cDNA a été effectuée afin d'obtenir uniquement notre major Meq circRNA sans les autres transcrits linéaires et circulaires issus de l'épissage tandis que la construction avec tout le gène avait été faite pour obtenir tous les transcrits. Cependant la construction composée uniquement du cDNA ne produit aucun transcrit et n'est donc pas utilisable.

Ces constructions sont très utiles pour une étude approfondie du lien entre la protéine et le circRNA et pour déterminer ce qu'il se passe lorsqu'uniquement un des deux est présent. Ces constructions sont également un point de départ pour la réalisation de virus recombinant. La construction avec la mutation au niveau de la back jonction (D4) est la plus intéressante pour

l'étude du major Meq circRNA. Elle permettrait de voir lors de l'infection virale ce qu'il se passe lorsque le major Meq circRNA est absent. Il est également nécessaire de comparer avec un virus recombinant muté au niveau de l'ATG. Ce virus permettrait de voir ce qu'il se passe lorsque la protéine Meq est absente mais pas le circRNA.

Sachant que les circRNAs possèdent possiblement de multiples rôles, une analyse bio-informatique a été réalisée. Cette analyse a été réalisée afin de trouver des correspondances entre le major Meq circRNA et différents miRNAs. Cinq complémentarités ont été trouvées avec cinq miRNAs viraux. Il s'agit d'un potentiel rôle de notre major Meq circRNA qui reste à explorer.

Une autre question s'est posée quant à l'abondance du major Meq circRNA. Ce circRNA apparaît surexprimé par rapport aux autres circRNAs mais par PCR il est impossible de déterminer la quantité car le nombre de cycles est poussé au maximum. Un protocole de northern blot a alors été mis en place afin de pouvoir quantifier l'abondance de notre circRNA en comparaison de l'abondance des transcrits linéaires. Le northern blot a été imaginé avec trois sondes permettant de mettre en évidence trois types de transcrits : ceux issus de la back jonction D4/A3, c'est-à-dire les circRNAs, ceux comprenant l'exon A3/D3, c'est-à-dire tous les transcrits issus de *meq* et ceux comprenant l'exon A3/D3 ainsi que l'intron suivant, c'est-à-dire les transcrits linéaires. Quatre transcrits ont été mis en évidence avec les sondes des transcrits linéaires et exoniques et au niveau de la sonde circulaire trois transcrits sont visibles.

Cependant afin d'être optimal, le northern blot nécessite encore quelques mises au point. En premier lieu, les résultats sont présents uniquement pour les échantillons d'ARN provenant de MSB1. Cette absence de résultats pour les échantillons correspondant au virus réactivé pose problème car des circRNAs ont été découverts lors de ce stade du cycle infectieux. L'absence de bande oriente l'hypothèse sur une absence de transcrits circulaires pour vérifier cela un northern blot doit être réalisé avec des échantillons traités à la RNase R afin de voir s'il y a une perte des différentes bandes.

Deuxièmement, il n'a pas été possible d'obtenir un ladder fonctionnel ce qui reste un frein énorme dans l'analyse des résultats. En effet, il est impossible d'estimer la taille des transcrits mis en évidence et donc de pouvoir déterminer de quel transcrit il s'agit. Afin de remédier à cela, une solution est envisageable. Il s'agit de la fabrication d'un ladder spécifique à une sonde, pour cela, une transcription *in vitro* devrait être effectuée sur des produits de PCR de tailles connues possédant la séquence spécifique de la sonde. Cette solution permettrait d'avoir sur chaque membrane un ladder qui serait détecté en même temps que les transcrits *meq*. Cependant, il devra être issu d'un génome autre que celui de GaHV-2 et du poulet pour pas que les sondes interfèrent.

Il est également possible, afin d'avoir une seconde technique permettant d'analyser l'expression du major Meq circRNA, de réaliser des qPCR. Cependant à la vue du nombre important de transcrits issus de cette région, un qPCR classique avec uniquement des amorces est impossible. Il faudra réaliser une sonde spécifique de la back jonction afin de pouvoir quantifier l'abondance du major Meq circRNA. Si une comparaison doit être faite, il sera nécessaire d'avoir une sonde spécifique pour chaque transcrit.

La question centrale reste cependant de découvrir le rôle de ce circRNA. Différentes études ont déjà été réalisées sur des circRNAs des herpesvirus. Ces études ont permis d'explorer les localisations et les rôles des circRNAs découverts. C'est le cas pour EBV où différents circRNAs ont été découverts. Cependant ces circRNAs ont une expression spécifique durant le cycle infectieux. Ces circRNAs sont uniquement exprimés durant les phases de latence et de réactivation. Ils sont également pour la majorité exprimés dans le noyau et ne possèdent donc pas de rôle d'éponges à miRNAs (Ungerleider et al. 2018). Chez HPV, un circRNA a également été découvert, le circE7. Ce circRNA est issu, comme le major Meq circRNA, de l'oncogène du virus et est localisé dans le cytoplasme. Ce circRNA a la capacité de produire la protéine E7 (Zhao et al. 2019). Ces études permettent de démontrer que les circRNAs d'un même virus peuvent avoir une localisation et une fonction différentes.

Dès lors, il serait intéressant d'explorer la localisation du major Meq circRNA afin d'orienter son rôle. En effet, le rôle est directement en lien avec la localisation, les circRNAs localisés dans le cytoplasme ont tendance à jouer le rôle d'éponges à miRNAs tandis que ceux localisés dans le noyau agiront comme régulateur transcriptionnel ou interviendront dans l'épissage. Cependant au vu de sa composition uniquement exonique, il est plus plausible que celui-ci soit localisé dans le cytoplasme.

Afin de confirmer la localisation, la réalisation d'un FISH (fluorescence *in situ* hybridization) est envisagée. Le FISH permet de localiser les ARNs via une sonde. Afin de mettre en évidence le major Meq circRNA, une sonde spécifique de la back jonction sera réalisée avec un système soit de fluorochrome à la fin de la séquence ou avec des bases maquées. Afin également de confirmer la localisation des circRNAs décrite dans la littérature, une seconde sonde pourrait être réalisée afin de mettre en évidence un circRNA possédant un intron et de voir s'il se trouve bien dans le noyau.

Pour ce qui est du rôle à explorer, deux rôles semblent plus relevant que les autres. Du fait de la complémentarité avec les miRNAs, il apparaît comme une potentielle éponge à miRNAs. Le second rôle potentiel est celui de coder pour une protéine. En effet, au niveau de la back jonction, un ATG est formé lors de la circularisation. Le major Meq circRNA possède une séquence codante de 378 nucléotides. Cette protéine est en partie similaire à la protéine Meq, la partie N-terminale est différente. En effet, sur les 126 acides aminés, 99 sont communs à la protéine Meq. Cependant, le major Meq ne possède pas d'IRES décrit mais selon Abe et al. (Abe et al. 2015), l'IRES n'est pas nécessaire à la traduction des circRNAs.

Afin d'étudier le potentiel rôle de traduction, la réalisation de western blot pourrait être une première étape. Il serait intéressant d'effectuer cette analyse sur des transfections effectuées avec les constructions contenant les ICS avec le gène *meq* wt, les ICS avec le gène *meq* muté au niveau de l'ATG et les ICS avec le gène *meq* muté au niveau de la back jonction. Cette première analyse permettrait de voir s'il y a la production d'une protéine similaire à Meq et permettrait de confirmer le rôle du major Meq circRNA. Dans un second temps, il faudrait réaliser un virus recombinant muté au niveau de la borne D4 et effectué de nouveau un western blot. Cela permettrait de mettre en évidence, si elle existe, la perte de la protéine produite par le major Meq circRNA.

L'étude du rôle d'éponge à miRNAs peut poser problème car le major Meq circRNA est continuellement exprimé ce qui fait qu'il est difficile d'expliquer cette fonction. Si ce circRNA capture des miRNAs durant tout le cycle infectieux, il est compliqué de pouvoir trouver un intérêt. Son rôle peut être d'agir comme réservoir à miRNAs ou de servir de molécule de transport pour les miRNAs afin de se propager dans des cellules non infectées.

Afin de vérifier le rôle d'éponge à miRNAs, il serait intéressant de réaliser un système rapporteur luciférase. Ce système rapporteur serait constitué du gène ciblé par un miRNA couplé au rapporteur luciférase. Un contrôle de transfection doit également être réalisé. Ce système serait transfecter avec un vecteur d'expression du miRNA afin de voir s'il y a une inhibition de la luminescence. Pour terminer et vérifier le rôle d'éponge à miRNAs, la construction générant le major Meq circRNA serait transfectée et la luminescence serait analysée. Si le major Meq circRNA possède bien le rôle d'éponge pour ce miRNA, la luminescence serait présente. Il est nécessaire de réaliser six systèmes de ce type afin de vérifier ce potentiel rôle avec tous les miRNAs où une complémentarité a été trouvée. Cette méthode peut être assez compliquée car il est nécessaire de transfecté quatre plasmides simultanément. Une autre solution possible est de créer plusieurs lignées cellulaires, chacune exprimant un miRNAs et ensuite de transfecter les trois autres plasmides.

6. Conclusion

Contrairement aux idées des années 70, les circRNAs sont des éléments essentiels de la biologie jouant de nombreux rôles au niveau de la transcription et de la traduction. Il a également été confirmé que certains virus encodent pour des circRNAs dont GaHV-2 et à la vue de l'abondance et de la diversité des circRNAs encodés par ce dernier, il s'est avéré être un bon modèle pour leur étude. Ce projet a permis de découvrir : (i) qu'il existe différents circRNAs issus de l'oncogène majeur du virus ; (ii) qu'il existe un circRNA exprimé majoritairement issu de l'oncogène majeur ; (iii) que ce circRNA est continuellement exprimé durant l'infection virale ; (iv) et plusieurs rôles potentiels ont pu lui être prédit. Ces différentes découvertes permettent de se poser des questions sur l'intervention des circRNAs lors de l'infection virale.

Ce projet a permis de faire certaines découvertes mais de nombreuses recherches sont encore nécessaires afin de comprendre le rôle de ce major Meq circRNA. Afin de finaliser ce projet, il serait intéressant de réaliser un virus recombinant afin de pouvoir étudier tout le cycle infectieux en l'absence du major Meq circRNA.

Une autre étude intéressante, en lien avec ce projet, serait d'étudier la souche vaccinale CVI988. Cette souche représente un virus atténué et l'étude des circRNAs au sein de celui-ci pourrait fournir un lien entre cette atténuation et l'abondance des circRNAs. Il est également possible que le fait de muter le génome afin d'empêcher la formation du major Meq circRNA atténue le virus ce qui pourrait être une piste dans la compréhension de la régulation de l'oncogénèse induite par Meq.

Bibliographie

- Abe, Naoko, Ken Matsumoto, Mizuki Nishihara, Yukiko Nakano, Aya Shibata, Hideto Maruyama, Satoshi Shuto, et al. 2015. « Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells ». *Scientific Reports* 5 (1): 16435. <https://doi.org/10.1038/srep16435>.
- Awasthi, Rajendra, Anurag Kumar Singh, Gaurav Mishra, Anand Maurya, Dinesh Kumar Chellappan, Gaurav Gupta, Philip Michael Hansbro, et Kamal Dua. 2018. « An Overview of Circular RNAs ». In *Circular RNAs*, édité par Junjie Xiao, 1087:3-14. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_1.
- Baralle, Marco, et Francisco Ernesto Baralle. 2018. « The Splicing Code ». *Biosystems* 164 (février): 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.11.002>.
- Bartschat, Sebastian, et Tore Samuelsson. 2010. « U12 Type Introns Were Lost at Multiple Occasions during Evolution ». *BMC Genomics* 11 (1): 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-106>.
- Boodhoo, Nitish, Angila Gurung, Shayan Sharif, et Shahriar Behboudi. 2016. « Marek's Disease in Chickens: A Review with Focus on Immunology ». *Veterinary Research* 47 (1): 119. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0404-3>.
- Bose, Rumela, et Rupasri Ain. 2018. « Regulation of Transcription by Circular RNAs ». In *Circular RNAs*, édité par Junjie Xiao, 1087:81-94. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_7.
- Chang, CY, et P Sarnow. 1995. « Initiation of protein synthesis by the eukaryotic ». *Transl Appar Circ RNAs Sci* 268: 415-17.
- Coupeau, Damien. 2011. « Etude Transcriptionnelle et Post-Transcriptionnelle de La Région IRL/TRL Du Virus de La Maladie de Marek. » Tours: Université François-Rabelais.
- Couteaudier, Mathilde, et Caroline Denesvre. 2014. « Marek's Disease Virus and Skin Interactions ». *Veterinary Research* 45 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-36>.
- Ebbesen, Karoline K., Thomas B. Hansen, et Jørgen Kjems. 2017. « Insights into Circular RNA Biology ». *RNA Biology* 14 (8): 1035-45. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1271524>.
- Eger, Nicole, Laura Schoppe, Susanne Schuster, Ulrich Laufs, et Jes-Niels Boeckel. 2018. « Circular RNA Splicing ». In *Circular RNAs*, édité par Junjie Xiao, 1087:41-52. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_4.
- Enuka, Yehoshua, Mattia Lauriola, Morris E. Feldman, Aldema Sas-Chen, Igor Ulitsky, et Yosef Yarden. 2016. « Circular RNAs Are Long-Lived and Display Only Minimal Early Alterations in Response to a Growth Factor ». *Nucleic Acids Research* 44 (3): 1370-83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1367>.
- Gennart, Isabelle, Damien Coupeau, Srdan Pejaković, Sylvie Laurent, Denis Rasschaert, et Benoit Muyllkens. 2015. « Marek's Disease: Genetic Regulation of Gallid Herpesvirus 2 Infection and Latency ». *The Veterinary Journal* 205 (3): 339-48. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.038>.

- Hansen, T. B., J. Kjems, et C. K. Damgaard. 2013. « Circular RNA and MiR-7 in Cancer ». *Cancer Research* 73 (18): 5609-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1568>.
- Hsiao, Kuei-Yang, H Sunny Sun, et Shaw-Jenq Tsai. 2017. « Circular RNA – New Member of Noncoding RNA with Novel Functions ». *Experimental Biology and Medicine* 242 (11): 1136-41. <https://doi.org/10.1177/1535370217708978>.
- Kristensen, Lasse S., Maria S. Andersen, Lotte V. W. Stagsted, Karoline K. Ebbesen, Thomas B. Hansen, et Jørgen Kjems. 2019. « The Biogenesis, Biology and Characterization of Circular RNAs ». *Nature Reviews Genetics* 20 (11): 675-91. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>.
- Kung, H.-J., L. Xia, P. Brunovskis, D. Li, J. L. Liu, et L. F. Lee. 2001. « Meq: An MDV-Specific BZIP Transactivator with Transforming Properties ». In *Marek's Disease*, édité par Kanji Hirai, 255:245-60. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56863-3_10.
- Lee, Yeon, et Donald C. Rio. 2015. « Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing ». *Annual Review of Biochemistry* 84 (1): 291-323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>.
- Li, Xiang, Li Yang, et Ling-Ling Chen. 2018. « The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs ». *Molecular Cell* 71 (3): 428-42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.034>.
- Liang, Dongming, et Jeremy E. Wilusz. 2014. « Short Intronic Repeat Sequences Facilitate Circular RNA Production ». *Genes & Development* 28 (20): 2233-47. <https://doi.org/10.1101/gad.251926.114>.
- Liu, Qianwen, Mingxia Shuai, et Yong Xia. 2019. « Knockdown of EBV-Encoded CircRNA CircRPMS1 Suppresses Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation and Metastasis through Sponging Multiple MiRNAs ». *Cancer Management and Research* Volume 11 (août): 8023-31. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S218967>.
- López-Jiménez, Elena, Ana M. Rojas, et Eduardo Andrés-León. 2018. « RNA Sequencing and Prediction Tools for Circular RNAs Analysis ». In *Circular RNAs*, édité par Junjie Xiao, 1087:17-33. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_2.
- Mumtaz, Peerzada Tajamul, Qamar Taban, Mashooq Ahmad Dar, Shabir Mir, Zulfkar ul Haq, Sajad Majeed Zargar, Riaz Ahmad Shah, et Syed Mudassir Ahmad. 2020. « Deep Insights in Circular RNAs: From Biogenesis to Therapeutics ». *Biological Procedures Online* 22 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00122-8>.
- Nair, Venugopal. 2013. « Latency and Tumorigenesis in Marek's Disease ». *Avian Diseases* 57 (2s1): 360-65. <https://doi.org/10.1637/10470-121712-Reg.1>.
- Parcells, M., V. Arumugaswami, J. Prigge, K. Pandya, et R. Dienglewicz. 2003. « Marek's Disease Virus Reactivation from Latency: Changes in Gene Expression at the Origin of Replication ». *Poultry Science* 82 (6): 893-98. <https://doi.org/10.1093/ps/82.6.893>.
- Qian, Zheng, Peter Brunovskis, Frank Rauscher Iii, Lucy Lee, et Hsing-Jien Kung. 1995. « Transactivation Activity of Meq, a Marek's Disease Herpesvirus BZIP Protein Persistently Expressed in Latently Infected Transformed T Cells ». *J. VIROL.* 69: 8.

- Qu, Shibin, Xisheng Yang, Xiaolei Li, Jianlin Wang, Yuan Gao, Runze Shang, Wei Sun, Kefeng Dou, et Haimin Li. 2015. « Circular RNA: A New Star of Noncoding RNAs ». *Cancer Letters* 365 (2): 141-48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>.
- Santer, Laura, Christian Bär, et Thomas Thum. 2019. « Circular RNAs: A Novel Class of Functional RNA Molecules with a Therapeutic Perspective ». *Molecular Therapy* 27 (8): 1350-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.07.001>.
- Shi, Y., X. Jia, et J. Xu. 2020. « The New Function of CircRNA: Translation ». *Clinical and Translational Oncology*, mai. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02371-1>.
- Sibley, Christopher R., Lorea Blazquez, et Jernej Ule. 2016. « Lessons from Non-Canonical Splicing ». *Nature Reviews Genetics* 17 (7): 407-21. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.46>.
- Tagawa, Takanobu, Shaojian Gao, Vishal N. Koparde, Mileidy Gonzalez, John L. Spouge, Anna P. Serquiña, Kathryn Lurain, et al. 2018. « Discovery of Kaposi's Sarcoma Herpesvirus-Encoded Circular RNAs and a Human Antiviral Circular RNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (50): 12805-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816183115>.
- Teng, M., Z.-H. Yu, A.-J. Sun, Y.-J. Min, J.-Q. Chi, P. Zhao, J.-W. Su, Z.-Z. Cui, G.-P. Zhang, et J. Luo. 2015. « The Significance of the Individual Meq-Clustered MiRNAs of Marek's Disease Virus in Oncogenesis ». *Journal of General Virology* 96 (Pt_3): 637-49. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000013>.
- Teng, Man, Zu-Hua Yu, Pu Zhao, Guo-Qing Zhuang, Zi-Xiang Wu, Lu Dang, Hui-Zhen Li, et al. 2017. « Putative Roles as Oncogene or Tumour Suppressor of the Mid-Clustered MicroRNAs in Gallid Alphaherpesvirus 2 (GaHV2) Induced Marek's Disease Lymphomagenesis ». *Journal of General Virology* 98 (5): 1097-1112. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000786>.
- Turunen, Janne J., Elina H. Niemelä, Bhupendra Verma, et Mikko J. Frilander. 2013. « The Significant Other: Splicing by the Minor Spliceosome: Splicing by the Minor Spliceosome ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (1): 61-76. <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>.
- Ungerleider, Nathan, Monica Concha, Zhen Lin, Claire Roberts, Xia Wang, Subing Cao, Melody Baddoo, et al. 2018. « The Epstein Barr Virus CircRNAome ». Édité par Bryan R. Cullen. *PLOS Pathogens* 14 (8): e1007206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007206>.
- Vautherot, Jean-François, Christian Jean, Laetitia Fragnet-Trapp, Sylvie Rémy, Danièle Chabanne-Vautherot, Guillaume Montillet, Aurélie Fuet, Caroline Denesvre, et Bertrand Pain. 2017. « ESCDL-1, a New Cell Line Derived from Chicken Embryonic Stem Cells, Supports Efficient Replication of Mardiviruses ». Édité par Zheng Xing. *PLOS ONE* 12 (4): e0175259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175259>.
- Venugopal, K. 2000. « Marek's Disease: An Update on Oncogenic Mechanisms and Control ». *Research in Veterinary Science* 69 (1): 17-23. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0396>.
- Wang, Yan, Jing Liu, Bo Huang, Yan-Mei Xu, Jing Li, Lin-Feng Huang, Jin Lin, et al. 2015. « Mechanism of Alternative Splicing and Its Regulation ». *Biomedical Reports* 3 (2): 152-58. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>.

- Wilusz, Jeremy E. 2018. « A 360° View of Circular RNAs: From Biogenesis to Functions ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 9 (4): e1478. <https://doi.org/10.1002/wrna.1478>.
- Zhang, Xiao-Ou, Rui Dong, Yang Zhang, Jia-Lin Zhang, Zheng Luo, Jun Zhang, Ling-Ling Chen, et Li Yang. 2016. « Diverse Alternative Back-Splicing and Alternative Splicing Landscape of Circular RNAs ». *Genome Research* 26 (9): 1277-87. <https://doi.org/10.1101/gr.202895.115>.
- Zhang, Yang, Laidi Wang, Lingling Qiu, Rui Pan, Hao Bai, Yong Jiang, Zhixiu Wang, Yulin Bi, Guohong Chen, et Guobin Chang. 2019. « Expression Patterns of Novel Circular RNAs in Chicken Cells after Avian Leukosis Virus Subgroup J Infection ». *Gene* 701 (juin): 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.030>.
- Zhao, Jiawei, Eunice E. Lee, Jiwoong Kim, Rong Yang, Bahir Chamseddin, Chunyang Ni, Elona Gusho, et al. 2019. « Transforming Activity of an Oncoprotein-Encoding Circular RNA from Human Papillomavirus ». *Nature Communications* 10 (1): 2300. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10246-5>.
- Zhou, Linyi, et Shijun J. Zheng. 2019. « The Roles of MicroRNAs (MiRNAs) in Avian Response to Viral Infection and Pathogenesis of Avian Immunosuppressive Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (21): 5454. <https://doi.org/10.3390/ijms20215454>.
- Zhuang, Guoqing, Aijun Sun, Man Teng, et Jun Luo. 2017. « A Tiny RNA That Packs a Big Punch: The Critical Role of a Viral MiR-155 Ortholog in Lymphomagenesis in Marek's Disease ». *Frontiers in Microbiology* 8 (juin): 1169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01169>.